

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/058977 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/62, 15/12, C07K 14/705, G01N 33/68, C12Q
1/68, C07K 16/28, A01K 67/027, C12N 5/10

RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101 rue de Tol-
biac, F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003860

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **DE
WAARD, Michel** [FR/FR]; Lotissement du Frou, F-38380
Saint-Christophe/Guiers (FR). **DUPUIS, Alain** [FR/FR];
35 rue C. Kogan, F-38100 Grenoble (FR). **GRUN-
WALD, Didier** [FR/FR]; 3 rue des Brieux, F-38120
Saint-Egreve (FR). **SANDOZ, Guillaume** [FR/FR]; 11
rue Saint-Jacques, F-38000 Grenoble (FR).

(22) Date de dépôt international :
22 décembre 2003 (22.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/16576 23 décembre 2002 (23.12.2002) FR

(74) Mandataire : **CABINET ORES**; 36 rue de St Péters-
bourg, F-75008 Paris (FR).

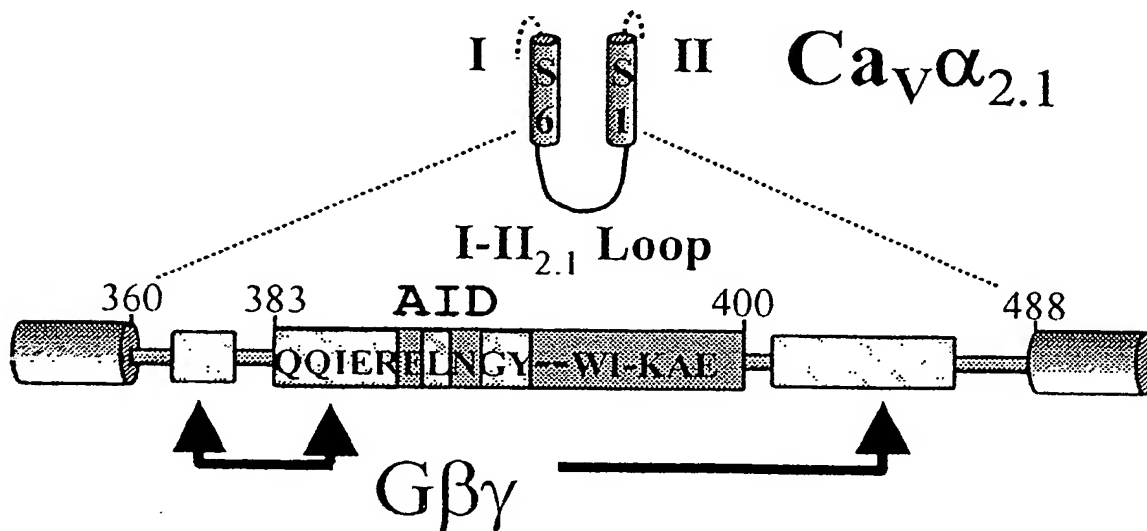
(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE** [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). **IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA**

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: CHIMERIC PROTEIN FOR THE SCREENING OF AGONISTS AND ANTAGONISTS OF CELL SIGNALLING
PATHWAYS THAT ARE DEPENDENT ON G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

(54) Titre : PROTEINE CHIMERIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DES VOIES DE SIGNA-
LISATION CELLULAIRE DEPENDANTES DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G



(57) Abstract: The invention relates to a chimeric protein which is derived from a high-threshold calcium channel and which is characterized in that it consists of at least one β subunit or a fragment of same comprising at least the BID domain, which is fused at the NH₂ or COOH end thereof with the I-II loop of an α_1 subunit or a fragment of same comprising at least the AID domain. The invention also relates to the applications of said protein in the study of cell signalling pathways that are dependent on G-protein-coupled receptors (GPCR) and the identification of compounds that modulate the activity of G proteins.

[Suite sur la page suivante]



SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé :** Protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH₂#191 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α 1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID, et ses applications pour l'étude des voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'identification de composés modulant l'activité des protéines G.

PROTEINE CHIMERIQUE POUR LE CRIBLAGE D'AGONISTES ET D'ANTAGONISTES DES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DEPENDANTES DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G

La présente invention est relative à une protéine recombinante
5 chimérique dérivée des sous-unités α_1 et β de canaux calciques haut-seuil, ainsi qu'à ses applications pour l'étude des voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'identification de composés modulant l'activité des protéines G.

La classe des RCPG comprend plus de mille membres identifiés,
10 codés par des gènes représentant 2 à 5 % du potentiel de codage du génome de vertébrés (El Far et Betz, Biochem. J., 2002, 365, 329-336) ; on dénombre 27 gènes codant pour des sous-unités $G\alpha$, 5 pour les sous-unités $G\beta$, et 14 pour les sous-unités $G\gamma$, (Albert et Robillard, Cell, 2002, 14, 407-418).

De nombreux processus biologiques comme la régulation
15 synaptique, la réponse aux hormones et aux phéromones, le guidage cellulaire (chémoattraction ou chémorépulsion) ou la vision impliquent les récepteurs couplés aux protéines G. En effet, les RCPG sont capables d'assurer la reconnaissance et la transduction de messages aussi variés que ceux des acides aminés (acide glutamique...), des peptides (angiotensine, neurotensine, somatostatine...), des
20 protéines (thyrotropine (TSH), hormone folliculo-stimulante (FSH)...), des amines (acétylcholine, adrénaline, sérotonine...), des lipides (prostaglandines, leukotriènes...), des nucléotides et des nucléosides (adénosine ou ATP). Les ions (Ca^{++}), les molécules odorantes et gustatives, les photons et les phéromones font également partie des signaux extracellulaires reconnus par les RCPG (pour revue, voir
25 Gether, Endocrine reviews, 2000, 21, 90-113 et Albert et Robillard, précités).

Le signal extracellulaire est transduit à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques liant les nucléotides guanyliques (GDP et GTP), composées des sous-unités nommées $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$; la reconnaissance du signal extracellulaire par le RCPG entraîne l'activation des protéines G qui se
30 traduit par la dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$, et $G\beta\gamma$, et la liaison de la sous-unité $G\alpha$ au GTP.

Plusieurs effecteurs intracellulaires peuvent être modulés directement ou indirectement par l'activation des différentes sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, des protéines-G. Les effecteurs contrôlés par les sous-unités $G\alpha$ peuvent être des enzymes (phospholipases A2 et C, adénylyl- et guanylylcyclases, c-jun kinase, tyrosine-
5 phosphatase (SH-PTP2)...), dont l'activation va influencer sur le taux de seconds messagers produits ou libérés (phosphoinositides et diacyls-glycérols, Ca^{++} , cAMP, cGMP...), des canaux (à conductances potassiques, calciques, sodiques ou chlores), des échangeurs ioniques (sodium/proton) ou plus récemment des kinases (tyrosines
10 kinases Btk (Bruton's tyrosine kinase), MAP kinases (Mitogen-Activated protein kinase), (Albert et Robillard, précité).

$G\beta\gamma$ peut également moduler l'activité d'effecteurs au moins aussi nombreux que ceux contrôlés par $G\alpha$, à savoir : les canaux (à conductances sodique, calcique dépendante du voltage (N et P/Q) ou potassique à rectification entrante (GIRK : G protein inward rectifier K^+ channel)...), les enzymes dites « classiques »
15 (phospholipases A2 et C, adénylyl-cyclase I, II, IV, tyrosine-phosphatase (SH-PTP1)...), ainsi qu'un nombre important de kinases (phosphoinositide 3-kinase, récepteur β -adrénergique kinases, c-jun kinase, MAP kinases, tyrosine kinases Btk et *T-cell-specific kinase* (Tsk), (pour revue voir Albert et Robillard, précité).

Ainsi, l'étude de ces voies de signalisation et la recherche de drogues
20 agissant sur ces voies de signalisation présentent un intérêt thérapeutique important pour la recherche de nouveaux médicaments.

Il ressort de ce qui précède que l'activation des protéines G et leur dissociation en sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ est le carrefour d'un grand nombre de voies de signalisation et de régulation cellulaires. Par conséquent, l'analyse de l'activation de
25 ces protéines G permet d'étudier les voies de signalisation cellulaire, dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G et de cribler des agonistes et des antagonistes de ces voies de signalisation.

Pour analyser l'activation des protéines G, Janetopoulos et al., (Science, 2001, 291, 2408-2411) ont décrit une technique de suivi, *in vivo* en temps
30 réel, de l'interaction $G\alpha$ - $G\beta$. Cette technique, mise au point chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, est basée sur la cotransfection de deux constructions codant pour deux protéines chimères fluorescentes : $G\beta$ -YFP et $G\alpha_2$ -CFP. L'interaction entre

les deux chimères induit un processus de transfert de fluorescence (FRET) qui permet un suivi en temps réel de leur interaction dans le cellule vivante. Les deux chimères construites par Janetopoulos et al. sont capables de former un complexe qui interagit de manière fonctionnelle avec le récepteur à l'AMPc et peut être activé par du GTP γ S.

5 Cette technique utilisant la fluorescence est adaptable aux approches de criblage à haut débit. Toutefois, du fait de la compétition avec des sous-unités G α ou G $\beta\gamma$ endogènes supprimant le processus de FRET, cette approche ne peut fonctionner que dans des cellules délétées génétiquement de leur protéine G équivalente endogène. De plus, chez les vertébrés, les différents isoformes de protéines G sont impliquées dans
10 la réponse à l'activation des différents récepteurs de type RCPG. En conséquence, l'approche de Janetopoulos et al. suppose la construction d'une chimère et d'une lignée cellulaire spécifiquement délétée pour chaque isotype de protéine G étudié.

Il ressort de ce qui précède qu'il n'existe pas d'outil ubiquitaire, simple à mettre en œuvre, pour évaluer l'activation des protéines G dans des cellules
15 eucaryotes.

Les canaux calciques comprennent des canaux de type bas-seuil, s'activant par de faibles dépolarisations et des canaux de type haut-seuil, s'activant par de fortes dépolarisations. Les canaux de type haut-seuil représentent un complexe hétéromultimérique $\alpha_1\alpha_2\delta\beta$ et γ , dans lequel la sous-unité α_1 membranaire,
20 constituant le canal proprement dit, est associée à une sous-unité intracellulaire régulatrice β (ou Ca $\nu\beta$), par l'intermédiaire de son domaine d'interaction (domaine AID pour *alpha interaction domain*), présentant un motif conservé : QQ-E--L-GY--WI---E (code à une lettre ; - représentant n'importe quel acide aminé ; Pragnell et al., *Nature*, 1994, 368, 67-70 ; figure 1) dans lequel les résidus Y392, W395 et I396 sont
25 essentiels pour la liaison de la sous-unité β (De Waard et al., FEBS, 1996, 380, 272-276). La sous-unité régulatrice β se lie au domaine AID par l'intermédiaire de son ~~domaine~~ BID (*beta interaction domain* ; DeWaard et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 12056-12064) qui est inclus dans un domaine *GK-like* (Hanlon et al., FEBS, 1999, 445, 366-370).

30 Sept sous-unités α_1 ont été identifiés : α_{1A} (Ca $\nu\alpha_{2.1}$), α_{1B} (Ca $\nu\alpha_{2.2}$), α_{1C} (Ca $\nu\alpha_{2.3}$), formant respectivement les canaux neuronaux de type P/Q et N et les

canaux de type R, régulés par les protéines G (canaux sensibles aux protéines G) et α_{1S} ($Ca_v\alpha_{1.1}$), α_{1c} ($Ca_v\alpha_{1.2}$), α_{1d} ($Ca_v\alpha_{1.3}$) et α_{1f} ($Ca_v\alpha_{1.4}$), formant les canaux de type L, insensibles aux protéines G, incluant les canaux cardiovasculaires (α_{1c}) et squelettiques (α_{1S}), (Lory et al., m/s, 2001, 10, 979-988).

5 Dans le système nerveux central, les canaux calciques haut-seuil de type N et P/Q sont directement impliqués dans le déclenchement du fonctionnement de la synapse : leur ouverture sous l'effet d'un potentiel d'action induit une entrée de calcium dans la terminaison présynaptique. Ce signal déclenche la sécrétion de neuromédiateurs tels que le glutamate dans la fente synaptique et, ainsi la propagation
10 de l'influx nerveux dans la dendrite post-synaptique. Les canaux N et P/Q sont régulés par des récepteurs liés aux protéines G trimériques (RCPG) tels que les récepteurs métabotropiques de classe III du glutamate (pour revue : El Far et Betz., précité) ou les récepteurs noradrénergiques, muscariniques, GABAergiques (GABA 5 γ -aminobutyric acid), sérotoninergiques, dopaminergiques, et aux opiacées (pour revue :
15 Hille, Trends NeuroSci., 1994, 17, 531-536). Il a été montré que le sous-complexe $G\beta\gamma$ est directement responsable d'une inhibition de l'activité des canaux P/Q qui résulte d'une fixation directe de $G\beta\gamma$ sur la boucle intra-cytoplasmique reliant les domaines membranaires I et II (boucle I-II) de la sous-unité α_1 (De Waard et al., Nature, 1997, 385, 446-450). De fait, cette boucle présente plusieurs sites
20 d'interaction avec $G\beta\gamma$, chevauchants le domaine de liaison à la sous-unité régulatrice $Ca_v\beta$ (domaine AID ; Figure 1), dont un motif consensus **QQ--R-L-GY** inclus dans le domaine AID, est essentiel pour la liaison de $G\beta\gamma$ (Figure 1 ; De Waard et al., Nature 1997, 385, 446-450 ; Zamponi et al., Nature, 1997, 385, 442-446). De plus, la sous-unité régulatrice $Ca_v\beta$ semble contrecarrer l'effet fonctionnel des protéines G
25 (Bourinet et al., P.N.A.S., 1996, 93, 1486-1491). Ainsi, il semblerait que cet antagonisme implique une compétition physique entre la sous-unité $Ca_v\beta$ et la protéine $G\beta\gamma$ au niveau de la région AID de la boucle I-II (Dolphin et al., J. Physiol., 1998, 506, 3-11).

Les Inventeurs ont construit des protéines chimériques par fusion
30 NH_2 et/ou $COOH$ terminale :

(i) de la boucle I-II de la sous-unité α_1 de canaux calciques haut-seuil sensibles ou insensibles aux protéines G (respectivement, α_{1A} ou $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ constitutive d'un canal neuronal de type P/Q et α_{1c} ou $\text{Ca}_v\alpha_{1.2}$ constitutive d'un canal de type L cardiovasculaire) ou un fragment de celle-ci ; ladite boucle correspond aux positions 5 367 à 487 en référence à la séquence de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$, et comprend le domaine de liaison à une sous-unité β d'un canal calcique (ou domaine AID) et les sites de liaison à une sous-unité $G\beta$ d'une protéine G (figure 1), et

(ii) d'une sous-unité β d'un canal calcique haut-seuil, capable de se lier audit fragment de la sous-unité α_1 .

10 Ils ont montré que l'ensemble des protéines chimériques obtenues - comprenant la boucle I-II d'une sous-unité α_1 issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID,- possède des propriétés surprenantes d'interaction intramoléculaire entre les domaines de liaison des sous-unités α_1 et β du canal calcique, qui empêchent la 15 fixation de la chimère sur le domaine AID d'une sous-unité α_1 . Ils ont confirmé que ce masquage du domaine de liaison de la sous-unité β était bien dû à son interaction intramoléculaire avec le domaine AID, car la délétion du domaine AID de la chimère rétablit cette fixation. Ils ont également montré que la fixation de la chimère comprenant la boucle I-II d'une sous-unité α_{1A} "sensible aux protéines G", sur le domaine 20 d'interaction de la sous-unité α_1 est rétablie par addition de $G\beta\gamma$. Ce résultat a été confirmé par la mise en évidence *ex vivo*, de l'interaction d'une sous-unité β recombinante marquée avec un fluorophore de type Cy3 avec une chimère fluorescente de la sous-unité α_{1A} (GFP- α_{1A}), par mesure du transfert de fluorescence (FRET) en microscopie confocale. Ces propriétés leur ont permis de démontrer que 25 de manière inattendue, la régulation des canaux P/Q passe par un déplacement, par le complexe $G\beta\gamma$, de l'interaction entre la sous-unité régulatrice β et la sous-unité α du canal calcique et non par son inhibition comme cela avait été suggéré précédemment.

De manière plus précise, les Inventeurs ont montré que la protéine chimérique dérivée d'une sous-unité α_1 sensible aux protéines G existe sous deux 30 formes "fermée" ou "ouverte", respectivement en l'absence ou en présence de sous-unité $G\beta$ capable de se lier audit fragment de la sous-unité α_1 , soit sous forme de

monomère $G\beta$, soit sous forme d'hétérodimère $G\beta\gamma$. En l'absence de $G\beta$ (ou $G\beta\gamma$), la protéine chimérique est capable de se replier permettant ainsi aux domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique de s'associer par une liaison intramoléculaire stable (forme fermée). En présence de $G\beta$ (ou $G\beta\gamma$), la liaison intra-

5 moléculaire est détruite et les domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique se dissocient (forme ouverte), permettant ainsi à chacun des domaines d'interagir respectivement avec $G\beta$ (domaine d'interaction de la sous-unité α_1 : domaine AID) et/ou une sous-unité α_1 d'un canal calcique (domaine d'interaction de la sous-unité β : domaine BID).

10 De façon similaire, la protéine chimérique dérivée d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G est capable de se replier permettant ainsi aux domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique de s'associer par une liaison intramoléculaire stable (forme fermée). En conséquence, en présence d'antagonistes de cette liaison, autres que $G\beta$ ou $G\beta\gamma$, la liaison intramoléculaire peut également être

15 détruite et les domaines d'interaction des sous-unités α_1 et β du canal calcique se dissocier (forme ouverte), permettant ainsi à chacun des domaines d'interagir respectivement avec ledit antagoniste autre que $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ (domaine d'interaction de la sous-unité α_1 : domaine AID) et/ou une sous-unité α_1 d'un canal calcique (domaine d'interaction de la sous-unité β : domaine BID).

20 En conséquence, du fait du remaniement de leur structure en présence de sous-unités $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres ou bien d'autres antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β (passage de la forme fermée à la forme ouverte), les protéines chimériques dérivées des sous-unités α_1 et β de canaux calciques haut-seuil représentent des outils simples à mettre en oeuvre, sensibles, spécifiques et utiles pour les

25 applications suivantes :

- les protéines chimériques dérivées d'une sous-unité α_1 sensible aux protéines G (par exemple : α_{1A} , α_{1B} et α_{1E}) permettent de déterminer les variations de la concentration cellulaire en sous-unités $G\beta\gamma$ libres, *ex vivo*, en temps réel et donc de mesurer l'activation des protéines G dans les cellules : de telles protéines chimériques

30 représentent des biocapteurs ubiquitaires de l'activation des protéines G parfaitement adaptés à l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des

récepteurs couplés aux protéines G et au criblage d'agonistes/antagonistes de ces voies de signalisation capables d'augmenter ou de diminuer la concentration en sous-unités $G\beta\gamma$ libres dans les cellules et donc de moduler l'activité de ces voies de régulation et de signalisation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

5 - les protéines chimériques dérivées d'une sous-unité α_1 sensible ou résistante aux protéines G (par exemple : α_{1A} , α_{1B} , α_{1E} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1S} et α_{1F}) représentent des outils simples, sensibles et spécifiques, parfaitement adaptés au criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , capables de moduler l'activité de l'ensemble des canaux calciques haut-seuil.

10 - les protéines chimérique dérivées d'une sous-unité α_1 et d'une sous-unité β d'un canal calcique haut-seuil telles que définies ci-dessus, sont également utiles pour le contrôle systématique pharmaco-toxicologique de nouveaux médicaments en phase I et la recherche d'agonistes naturels de récepteurs orphelins. En effet, le clonage du génome humain a permis d'identifier environ 350 récepteurs

15 RCPG. Parmi ceux-ci, seulement 200 ont un ligand identifié. Les autres, appelés récepteurs orphelins, constituent potentiellement des cibles clefs pour l'identification de nouvelles voies de signalisation et de régulation cellulaire. La recherche d'agonistes et d'antagonistes de ces récepteurs revêt donc un intérêt majeur tant sur le plan de la recherche fondamentale que sur le plan thérapeutique.

20 En conséquence, la présente invention a pour objet une protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH_2 ou $COOH$ avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

25 Conformément à l'invention les domaines AID et BID sont tels que définis ci-dessus ; la boucle I-II de la sous-unité α_1 comprend le domaine AID de liaison à la sous-unité β et les sites de liaison à la sous-unité $G\beta$ d'une protéine G, dont un site consensus de liaison qui est inclus dans ce domaine AID. Ces différents domaines sont illustrés à la figure 1.

L'invention englobe les protéines chimérique issues des sous-unités α_1 et β de vertébrés, notamment de mammifères humains ou non-humains et de leurs orthologues chez les invertébrés.

Des protéines chimériques conformes à l'invention sont représentées
5 notamment par :

- une sous-unité β fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 , et

- le domaine *GK-like* d'une sous-unité β incluant le domaine BID (Hanlon et al., précité), fusionné à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II
10 d'une sous-unité α_1 .

Conformément à l'invention, la boucle I-II ou son fragment est, soit fusionné directement à l'extrémité NH_2 ou COOH de la sous-unité β ou de son fragment, soit les deux séquences sont séparées par un peptide espaceur dont la taille et la séquence en acides aminés sont tels que les domaines AID et BID de la protéine
15 chimérique contenant ledit espaceur sont aptes à interagir pour former une liaison intramoléculaire qui est déplacée en présence d'antagoniste (passage de la forme fermée à la forme ouverte) ; un tel peptide espaceur est notamment représenté par une séquence polyglycine.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine
20 chimérique, elle est issue d'un canal calcique haut-seuil sensible aux protéines G.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite protéine chimérique comprend un fragment d'une sous-unité α_1 sélectionnée parmi α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} .

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine
25 chimérique, ladite sous unité β est sélectionnée dans le groupe constitué par β_1 , β_2 , β_3 et β_4 .

L'invention englobe également les protéines chimériques constituées par des séquences fonctionnellement équivalentes aux séquences telles que définies ci-dessus, c'est-à-dire dont la sous-unité β et la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou leurs
30 fragments tels que définis ci-dessus sont capables de former une liaison intramoléculaire par l'intermédiaire de leurs domaines d'interaction ; ladite liaison

étant éventuellement détruite en présence de sous-unités $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres ou bien d'autres antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β ("forme ouverte"). Parmi ces séquences, on peut citer par exemple les séquences dérivées des séquences précédentes par :

- 5 - mutation (substitution et/ou suppression, et/ou addition) d'un ou plusieurs acides aminés des séquences telles que définies ci-dessus,
- modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, notamment par remplacement par une liaison différente de la liaison -CO-NH- (méthylène amino, 10 carba, cétométhylène, thioamide....) ou par introduction d'une liaison de type rétro ou rétro-inverso, et/ou,
- substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, par un résidu d'acide aminé non protéinogénique.

15 Par résidu d'acide aminé non protéinogénique, on entend tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel, notamment tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide 20 naturel.

La présente invention a notamment pour objet une protéine chimérique variant issue d'une protéine chimérique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation d'au moins un acide aminé dans les séquences de la dite sous-unité β et/ou de la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine chimérique, ledit variant possède une mutation qui modifie l'affinité de la sous-unité β ~~par~~ la boucle I-II de la sous-unité α_1 et/ou réciproquement ; de telles mutations permettent d'obtenir une protéine chimérique plus ou moins sensible à la concentration en sous-unité $G\beta$ ou $G\beta\gamma$ libres.

30 Parmi ces mutations on peut citer les mutations du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 , telles que décrites dans Pragnell et al., précité et De

Waard et al. FEBS, 1996, 380, 272-276, à savoir : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine chimérique ou de son variant, elle est couplée, de préférence de manière covalente, à
5 au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine, par exemple : un épitope antigénique, une étiquette du type polyhistidine, un composé luminescent (fluorophore telle que la GFP ou l'un de ses variants : CFP, YFP et BFP), radioactif, ou enzymatique.

Conformément à l'invention le dit couplage est réalisé par tout
10 moyen approprié, notamment par une liaison peptidique par l'intermédiaire des fonctions COOH et/ou NH₂ terminales de la chaîne peptidique, ou bien par une autre liaison covalente, telle que par exemple : une liaison ester, éther, thioéther, thioester, par l'intermédiaire de fonctions réactives de la chaîne latérale d'un acide aminé de la chaîne peptidique.

15 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la dite protéine chimérique comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son extrémité NH₂ et/ou COOH.

Les fluorophores accepteurs, par exemple CFP ou BFP, peuvent être couplés indifféremment à l'extrémité NH₂ ou COOH de la protéine chimérique,
20 les fluorophores donneurs, par exemple GFP ou YFP sont fusionnés à l'extrémité opposée de ladite protéine chimérique. De telles protéines chimériques sont utiles pour l'étude *ex vivo* en temps réel de l'activation des protéines G et le criblage de molécules capables de moduler cette activation par mesure du transfert de fluorescence (FRET).

En effet, le marquage par un composé luminescent présente
25 l'avantage d'obtenir un signal localisé qui ne nécessite pas la présence d'autres réactifs comme c'est le cas pour les marquages enzymatiques. Ce type de marquage permet également l'utilisation de phénomène tel que le transfert d'énergie qui peut s'effectuer selon différents mécanismes : transfert d'énergie par résonance, transfert d'énergie radiatif (l'accepteur absorbe la lumière émise par le donneur) et transfert d'électron.

30 Ce transfert d'énergie, entre un composé "donneur" (D) luminescent et un composé "accepteur" (A) luminescent ou non, et qui est dépendant de la distance entre A et D, a été utilisé pour la réalisation de nombreux dosages. On choisit D et A,

qui sont couplés à chaque extrémité de la protéine chimérique afin que le transfert d'énergie n'ait lieu que lorsque l'interaction intramoléculaire entre les domaines BID et AID a lieu (forme fermée). Ce phénomène se traduit par une diminution ou extinction de la luminescence de D et une émission de luminescence de A si celui-ci est luminescent, lorsque D est excité. Lors de ces dosages on mesure soit la variation de la luminescence de A, soit la variation de la luminescence de D ; la nature de A et de D étant variable. Par exemple, pour mesurer la variation de luminescence de A on peut utiliser comme donneur et accepteur deux protéines fluorescentes ou bien comme donneur un complexe de terres rares (europium, terbium) avec un chélate, un cryptate ou un macrocycle et comme accepteur une protéine fluorescente. La mesure de la variation de luminescence de D repose sur la capacité d'un composé (A) à diminuer ou supprimer la luminescence d'un autre composé (D) lorsque ceux-ci sont suffisamment proches ("Quench"). La gamme de molécules A pouvant être utilisées est donc plus étendue et inclut ainsi des composés non luminescents tels que des métaux lourds, des atomes lourds, des molécules chimiques comme par exemple le rouge de méthyle, des nanoparticules telles que celles vendues sous la dénomination Nanogold® par la société Nanoprobes (USA), ou bien encore les molécules vendues sous les dénominations DABCYL® (Eurogentec, Belgique), QSY Dyes (Molecular Probes Inc., USA), ElleQuencher® (Oswell/Eurogentec) ou Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies Inc., USA).

La présente invention a également pour objet un peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique telle que définie ci-dessus, situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou de leurs fragments tels que définis ci-dessus ; de tels peptides permettent notamment de produire des anticorps spécifiques de la protéine chimérique selon l'invention.

La présente invention a également pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine chimérique ou un peptide tels que définis ci-dessus.

Conformément à l'invention, lesdits anticorps sont soit des anticorps monoclonaux, soit des anticorps polyclonaux.

Ces anticorps peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, comprenant notamment l'immunisation d'un animal avec une protéine ou un peptide conforme à l'invention, afin de lui faire produire des anticorps dirigés contre ladite protéine ou ledit peptide.

5 De tels anticorps sont utiles notamment pour immobiliser la protéine chimérique sur un support solide, la purifier ou bien la détecter.

La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique ou un peptide tels que définis ci-
10 dessus et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'invention a également pour objet des sondes et des amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou de leurs fragments tels que définis-ci-dessus ; ces sondes et ces
15 amorces permettent de détecter/amplifier spécifiquement lesdites molécules d'acide nucléique codant la protéine chimérique selon l'invention.

L'invention a également pour objet d'autres amorces permettant d'amplifier spécifiquement la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 ou leurs fragments tels que définis-ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles sont
20 sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO : 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par des méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.
25 AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'invention peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR à l'aide d'une paire d'amorces appropriée ou bien par criblage de banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue.

30 Les molécules d'acides nucléiques dérivées, codant pour un variant de la protéine chimérique selon l'invention, sont obtenues par les méthodes classiques, permettant d'introduire des mutations dans une séquence d'acide nucléique, connues

en elles-mêmes, suivant les protocoles standards précités. Par exemple, la séquence codant pour un variant de la protéine chimérique selon l'invention peut-être obtenue par mutagenèse dirigée selon la méthode de Kunkel et al., (P.N.A.S., 1985, 82, 488-492).

5 La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant eucaryote ou procaryote, caractérisé en ce qu'il comprend un insert constitué par les molécules d'acides nucléiques codant pour une protéine chimérique telle que définie ci-dessus.

De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression
10 dans lequel ladite molécule d'acide nucléique ou l'un de ses fragments sont placés sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. En outre, ledit vecteur peut comprendre des séquences fusionnées en phase avec l'extrémité 5' et/ou 3' dudit insert, utiles pour l'immobilisation, et/ou la détection et/ou la purification de la protéine exprimée à partir dudit vecteur. De nombreux vecteurs dans
15 lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule
20 hôte. Par exemple, on peut utiliser des vecteurs viraux ou non-viraux comme des plasmides.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues
25 en elles-mêmes.

Selon un mode de réalisation dudit vecteur recombinant, il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 10 ; le plasmide
30 SEQ ID NO: 5 contient la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ de lapin fusionnée à l'extrémité C-terminale de sous-unité $Ca_v\beta_3$ de rat, sous le contrôle du promoteur CMV et le plasmide SEQ ID NO: 10 contient un insert constitué de 5' en 3' par la fusion en phase des fragments suivants : la séquence GAP-43, l'ADNc codant pour

l'EGFP (donneur de fluorescence), le domaine *GK-like* de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat, la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin et l'ADNc codant pour la CFP (accepteur de fluorescence).

La présente invention a également pour objet des cellules modifiées
5 par une protéine chimérique, une molécule d'acide nucléique ou bien un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdites cellules sont des cellules eucaryotes.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation,
10 lesdites cellules expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G (RCPG) ; lesdites cellules sont, soit des cellules exprimant constitutivement au moins un RCPG, soit des cellules modifiées qui expriment un RCPG recombinant.

Des cellules modifiées conformes à l'invention peuvent être obtenues par tous moyens, connus en eux-mêmes, permettant d'introduire une molécule
15 d'acide nucléique ou une protéine dans une cellule-hôte. Par exemple, dans le cas de cellules animales, on peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ; on peut également associer ladite séquence nucléotidique (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) ou peptidique avec une substance lui
20 permettant de franchir la membrane des cellules-hôte, par exemple une préparation de liposomes, de lipides ou de polymères cationiques, ou bien l'injecter directement dans la cellule hôte.

La présente invention a pour objet des animaux et en particulier des mammifères transgéniques non-humains, caractérisés en ce que tout ou partie de leurs
25 cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon l'invention. Il s'agit par exemple d'animaux dans lesquels on a introduit une séquence codant pour la protéine chimérique selon l'invention sous contrôle le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés. De tels animaux transgéniques sont utiles, notamment pour les étapes de criblages secondaires : i) pour évaluer le ciblage
30 cellulaire, voire tissulaire d'une molécule active sur les RCPG ou les canaux calciques, identifiée lors d'un criblage primaire, ii) pour étudier la biodisponibilité

d'une telle molécule, et iii) pour la recherche, en première approche, d'effets secondaires éventuels d'une telle molécule.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les
5 molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus, pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un
10 produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus, pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un
15 produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques, les molécules d'acides nucléiques, les vecteurs recombinants, les cellules modifiées et les mammifères non-humains transgéniques tels que définis ci-dessus, pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil ; de tels antagonistes sont utiles pour moduler l'activité de l'ensemble des canaux
20 calciques haut-seuil et représentent donc des médicaments susceptibles d'être utilisées dans le traitement des maladies liées à un dysfonctionnement de l'homéostasie calcique et des pathologies où la modulation de l'entrée calcique peut compenser un déficit cellulaire, notamment les épilepsies, les ataxies, les migraines, les hypo- et
25 hyper-calcémies musculaires, le diabète, et les maladies cardiovasculaires.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'étude des
voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés
aux protéines G est réalisée par une méthode comprenant au moins les étapes
suivantes :

30 a₁) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique
d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine
G, telles que définies ci-dessus,

b₁) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et

c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité Gβγ.

Une telle détermination permet d'évaluer les variations de la concentration cellulaire en sous-unités Gβγ libres et donc de mesurer l'activation des protéines G dans les cellules.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G est réalisée par une méthode comprenant au moins les étapes suivantes :

a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé aux protéines G, telles que définies ci-dessus,

b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié,

c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une sous-unité Gβγ, avant et après la mise en contact desdites cellules en b₂) avec une molécule à tester, et

d₂) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités Gβγ libres.

De manière avantageuse, lesdites cellules modifiées en a₁) ou en a₂) expriment une protéine chimérique telle que définie ci-dessus couplée à ses extrémités NH₂ et COOH, respectivement à un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c₁) ou en c₂) est effectuée par la technique de transfert de fluorescence (FRET).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil est réalisé par une méthode comprenant au moins les étapes suivantes :

5 a₃) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G telle que définie ci-dessus et avec un peptide comprenant le domaine AID d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G,

b₃) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

10 c₃) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide, et ladite
15 protéine chimérique est couplée à un marqueur permettant la mesure de ladite liaison en b₃), tel que défini ci-dessus, notamment un fluorophore.

L'invention a également pour objet une trousse pour la mise en œuvre des méthodes telles que définis ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle inclut au moins l'un des produits suivants : une protéine chimérique, un anticorps, un vecteur
20 recombinant, une cellule modifiée ou un mammifère non-humain transgénique, tels que définis ci-dessus.

La protéine chimérique selon l'invention présente les avantages suivants :

- elle constitue un biocapteur ubiquitaire des sous-unités G $\beta\gamma$ libres
25 endogènes, adapté à l'étude en temps réel des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés au protéine G, et au criblage systématique (criblage à haut-débit) de molécules capables de les moduler, potentiellement utilisables comme médicament pour le traitement des maladies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement de ces voies, notamment des pathologies du système
30 immunitaire (pour revue voir Lombardi et al, Crit. Rev. Immunology, 2002, 22, 141-163 ; Onuffer et Horuk, Trends in Pharmacol, 2002, 23, 459-467) et des pathologies neuropsychiatriques et cardiovasculaires (Seifert et Wenzel-Seifert, Naumyn-

Schmeideberg's Arch. Pharmacol. , 2002, 366, 381-416). En outre son utilisation est simple dans la mesure elle est permet de s'affranchir partiellement des problèmes de stoechiométrie puisque son utilisation ne fait intervenir que deux molécules ($\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha\text{-G}\beta\gamma$) au lieu de trois partenaires ($\text{Ca}_v\alpha/\text{Ca}_v\beta/\text{G}\beta\gamma$) pour les méthodes de l'art antérieur.

- elle est adaptée au criblage systématique (criblage à haut-débit) de molécules capables de moduler l'activité des canaux calciques à haut-seuil, potentiellement utilisables comme médicament pour le traitement des maladies dans lesquelles on observe un dysfonctionnement de l'homéostasie calcique et des pathologies où la modulation de l'entrée calcique peut compenser un déficit cellulaire telles que définies ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la protéine chimérique objet de la présente invention ainsi qu'au dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre le chevauchement, dans la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$, des domaines de liaison à la sous-unité β (domaine AID) et au complexe $\text{G}\beta\gamma$. Le domaine AID est représenté par une boîte noire (positions 383 à 400). Les sites de liaison pour la sous-unité $\text{G}\beta$ ($\text{G}\beta\gamma$) sont représentés par des boîtes hachurées ; le site en position centrale (QQ--R-L-GY) qui est essentiel pour la liaison de la sous-unité $\text{G}\beta$ ($\text{G}\beta\gamma$) est inclus dans le domaine AID.

- les figures 2 et 3 illustrent le déplacement de l'interaction $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}\text{-Ca}_v\beta$ par le complexe $\text{G}\beta\gamma$ des protéines G :

- la figure 2a illustre la liaison de la sous-unité β_3 (1 à 3 pM) avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion GST- $\text{AID}_{1.2}$ (1 μM),

- la figure 2b montre que la fusion de la sous-unité β_3 avec la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2.1}$ (Chimère $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}$) empêche sa liaison avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion GST- $\text{AID}_{1.2}$,

- la figure 2c montre que la délétion des 18 acides aminés du domaine $\text{AID}_{2.1}$ (Chimère $\text{Ca}_v\beta_3\text{-I-II}_{2.1}\Delta\text{AID}$) restaure la liaison de la sous-unité β_3 avec le domaine $\text{AID}_{1.2}$ de la protéine de fusion GST- $\text{AID}_{1.2}$,

- la figure 3 montre que l'addition de complexe $G\beta\gamma$ déplace l'interaction intramoléculaire entre la sous-unité $Ca_v\beta$ et la boucle I-II de la sous-unité $\alpha_{2.1}$ de la chimère $Ca_v\beta_3$ - I-II_{2.1}, permettant ainsi à la sous-unité β_3 de se lier avec le domaine AID_{1.2} de la protéine de fusion GST-AID_{1.2} ; la concentration de $G\beta\gamma$, capable de déplacer 50 % de la liaison entre la sous-unité $Ca_v\beta$ et domaine AID_{2.1} (IC₅₀) est de 160nM,

- les figures 4 à 7 illustrent l'analyse en FRET, du désassemblage du canal calcique P/Q, induit par le complexe $G\beta\gamma$:

- la figure 4a illustre le marquage au Cy3 de la sous-unité His- $Ca_v\beta_3$ purifiée. CB : coloration au bleu de Coomassie d'un gel SDS-PAGE illustrant la pureté de la protéine. FS = enregistrement de la fluorescence d'un gel non coloré montrant le marquage covalent de la protéine,

- la figure 4b illustre l'effet de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ couplée à un fluorochrome (Cy3- $Ca_v\beta_3$) sur la relation courant-voltage de canaux $Ca_v\alpha_{2.1}$ exprimés dans des ovocytes de xénopes, par comparaison avec la sous-unité $Ca_v\beta_3$ non marquée (injection d'ARNc),

- la figure 5a illustre l'observation en microscopie confocale de deux régions distinctes, d'ovocytes de xénopes contenant $Ca_v\alpha_{2.1}$ et Cy3- $Ca_v\beta_3$. T = transmission, F = fluorescence,

- la figure 5b illustre le spectre d'émission de la fluorescence de GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$, Cy3- $Ca_v\beta_3$ et (GFP- $Ca_v\alpha_{2.1}$ + Cy3- $Ca_v\beta_3$),

- la figure 6 illustre la cinétique de diminution du transfert de fluorescence induit par l'injection de 100 nM de $G\beta\gamma$. Panneau du haut : variations du spectre d'émission de la fluorescence et panneau du bas : variations du rapport des intensités de fluorescence (R_f) à 585 nm et 525 nm,

- la figure 7 illustre les valeurs R_f des ovocytes non-injectées (-), injectées avec $G\beta\gamma$ (100 nM) ou avec du $G\beta\gamma$ inactivé par la chaleur (HI- $G\beta\gamma$).

- la figure 8 (a à c) illustre la séquence du plasmide pcDNA3Cav β_3 -I-II_{2.1} (SEQ ID NO: 5) contenant la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ de lapin fusionnée à l'extrémité C-terminale de sous-unité $Ca_v\beta_3$ de rat, sous le contrôle du promoteur CMV.

- la figure 9 (a à c) illustre la séquence du plasmide pCHIC (SEQ ID NO: 10) dérivé du vecteur pEYFPmemb.(CLONTECH), contenant un insert constitué de 5' en 3' par la fusion en phase des fragments suivants : la séquence GAP-43, l'ADNc codant pour l'EGFP (donneur de fluorescence), le domaine *GK-like* de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat, la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin et l'ADNc codant pour la CFP (accepteur de fluorescence).

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

10 **EXEMPLE 1: CONSTRUCTION D'UNE PROTEINE CHIMERIQUE RECOMBINANTE $\text{Ca}_v\beta_3$ -I-II_{2.1}**

1). Matériels et méthodes

L'amplification PCR et le clonage de l'ADN recombinant sont réalisés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, en suivant le
15 protocoles standards tels que ceux décrits par exemple dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Un plasmide d'expression contenant un ADNc codant une protéine chimérique selon l'invention, constituée par la fusion C-terminale de la sous-unité β_3
20 de rat avec la boucle intracellulaire I-II de la sous-unité α_1 de lapin et a été construit de la façon suivante:

L'ADNc de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de rat (correspondant aux positions 98 à 1545 de la séquence GENBANK M88755) est amplifiée par PCR à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes:

- 25 - 5'-TTTGGTACCATGGATGACGACTCCTACGTGCCCGGGTTTGAGGACTCGGAGGCGGGTT-3' (SEQ ID NO: 1), et
- 5'-GCGGAATTCGTAGCTGTCCTTAGGCCAAGGCCGGTTACGCTGCCAGTT-3', (SEQ ID NO: 2).

Le fragment ainsi obtenu a été cloné entre les sites *Kpn I* et *EcoR I* du plasmide d'expression (pcDNA3, IN VITROGEN) pour donner le plasmide recombinant pcDNA3- $\text{Ca}_v\beta_3$.
30

Le fragment d'ADNc correspondant à la boucle I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ de lapin (positions 1383 à 1754 de la séquence GENBANK X57477), dont la

séquence est illustrée par la figure 1, a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

- 5'-GGGGAATTCGCCAAAGAAAGGGAGCGGGTGGAGAAC-3' (SEQ ID NO: 3 ; De Waard et al., précité et Bichet et al., Neuron, 2001, 25, 177-190), et
- 5 - 5'-TTTGAATTCTTACTGAGTTTTGACCATGCGACGGATGTAGAAACGCATTCT-3' (SEQ ID NO: 4).

Le fragment obtenu a été cloné au site *EcoR I* du plasmide pcDNA3-Cav β 3 pour donner le plasmide recombinant pcDNA3-Cav β 3-I-II_{2.1}.

Un plasmide contrôle contenant un ADNc codant une protéine chimérique constituée par la fusion C-terminale de la sous-unité β 3 de rat avec la
 10 boucle intracellulaire I-II de la sous-unité Cav α _{2.1} de lapin déletée du domaine AID a été construit de façon similaire ; le plasmide recombinant ainsi obtenu est dénommé pcDNA3-Cav β 3-I-II_{2.1} Δ AID.

2) Résultats

Le plasmide recombinant pcDNA3-Cav β 3-I-II_{2.1} présente la
 15 séquence SEQ ID NO: 5. La séquence peptidique déduite de la séquence nucléotique obtenue par séquençage automatique de l'insert cloné dans le plasmide pcDNA3-Cav β 3-I-II_{2.1} présente la séquence attendue pour une protéine chimérique selon l'invention. De même la séquence peptidique déduite de la séquence nucléotique obtenue par séquençage automatique de l'insert cloné dans le plasmide pcDNA3-
 20 Cav β 3-I-II_{2.1} Δ AID correspond à celle attendue pour une protéine chimérique déletée du domaine AID.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE IN VITRO DU DEPLACEMENT DE L'INTERACTION Ca ν α _{2.1}-Ca ν β PAR LE COMPLEXE G $\beta\gamma$ DES PROTEINES G.

25 1) Matériels et méthodes

L'expression de l'ADN recombinant et l'analyse des protéines
 recombinantes sont réalisés par les techniques classiques connues de l'Homme du
 métier, en suivant le protocoles standards tels que ceux décrits par exemple dans
Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and
 30 son Inc, Library of Congress, USA) et dans *Current protocols in Immunology* (John E.
 Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

a) Expression des protéines chimériques recombinantes et de la fusion GST-AID_{1,2}

Les protéines chimériques Ca_vβ₃-I-II_{2,1} et Ca_vβ₃-I-II_{2,1}ΔAID, et la sous-unité Ca_vβ₃, sont transcrites et traduites *in vitro* en présence de [³⁵S]-méthionine, à partir des plasmides tels que décrits à l'exemple 1, à l'aide du kit TNT system
5 PROMEGA, en suivant les instructions du fabricant.

La protéine de fusion GST-AID_{1,2} décrite dans Pragnell et al., précité, est produite et purifiée comme décrit par les auteurs précédents. La protéine GST produite et purifiée dans les mêmes conditions est utilisée comme contrôle.

b) Analyse *in vitro* de la régulation de l'interaction Ca_vα_{2,1}-Ca_vβ par le complexe Gβγ des protéines G.
10

L'analyse *in vitro* de la régulation de l'interaction Ca_vα_{2,1}-Ca_vβ par le complexe Gβγ des protéines G, est réalisée en suivant les protocoles tels que décrits dans De Waard et al., Nature, 1997, 385, 446-450. De manière plus précise, la sous-unité β₃ et les protéines chimériques marquées ([³⁵S] Ca_vβ₃, [³⁵S] Ca_vβ₃-I-II_{2,1} et [³⁵S]
15 Ca_vβ₃-I-II_{2,1}ΔAID) sont incubées en l'absence ou en présence de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} ou de la protéine GST, et éventuellement en présence de quantités croissantes de Gβγ (10 à 900 nM, CALBIOCHEM).

Le produit d'incubation est séparé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et le gel est autoradiographié.

20 **2) Résultats**

Les résultats illustrés dans les figures 2 et 3 sont les suivants:

- la figure 2a montre que la sous-unité β₃ (1 à 3 pM) se lie avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2} (1 μM),
- la figure 2b montre que la fusion de la sous-unité β₃ avec la boucle I-II de la sous-unité α_{2,1} (Chimère Ca_vβ₃- I-II_{2,1}) empêche sa liaison avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2},
25
- la figure 2c montre que la délétion des 18 acides aminés du domaine AID_{2,1} (Chimère Ca_vβ₃- I-II_{2,1}ΔAID) restore la liaison de la sous-unité β₃ avec le domaine AID_{1,2} de la protéine de fusion GST-AID_{1,2},
- la figure 3 montre que l'addition de complexe Gβγ déplace
30 l'interaction intramoléculaire entre la sous-unité Ca_vβ et la boucle I-II de la sous-unité

$\alpha_{2.1}$ de la chimère $\text{Ca}_v\beta_3$ - I-II_{2.1}, permettant ainsi à la sous-unité β_3 de se lier avec le domaine AID_{1.2} de la protéine de fusion GST-AID_{1.2} ; la concentration IC₅₀ de $\text{G}\beta\gamma$, capable de déplacer 50 % de la liaison entre la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ et domaine AID_{2.1}, après 30 min d'incubation à 30°C, est de 160nM; cette valeur est 2 à 3 fois plus élevée que celle relatives à l'affinité de $\text{G}\beta\gamma$ pour la boucle I-II_{2.1}, précédemment rapportées (De Waard et al., Nature , 1997, 385, 446-450).

EXEMPLE 3 : MISE EN EVIDENCE *EX VIVO* DU DEPLACEMENT DE L'INTERACTION $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ - $\text{Ca}_v\beta$ PAR LE COMPLEXE $\text{G}\beta\gamma$ DES PROTEINES G.

1) Matériels et méthodes

a) Marquage au Cy3 de la protéine recombinante His- $\text{Ca}_v\beta_3$ purifiée.

La protéine recombinante His- $\text{Ca}_v\beta_3$ purifiée (Geib et al., Biochem J., 2002, 364, 285-292 ; Fathallah et al., Eur. J. Neurosci., 2002, 16, 219-228) est couplée au maleimide de Cy3 monoréactif en suivant les instructions du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech).

b) Injection des ovocytes de xénope et enregistrements électrophysiologiques.

La préparation, l'injection des ovocytes de xénopes et les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés comme décrit dans Geib et al., précité. Les effets des complexes $\text{G}\beta\gamma$ sur la relation courant-voltage et l'inactivation de l'état d'équilibre sont analysés 30 min après l'injection.

c) Mesure du transfert de fluorescence (FRET).

Les ovocytes sont analysés en microscopie confocale (microscope TCS-SP2, LEICA, en mode « XYλ »), 4 à 7 jours après l'injection.

L'émission de fluorescence est enregistrée à l'aide d'un laser à argon avec une excitation à 488 nm et un miroir dichroïque (488/543/633). La fluorescence est mesurée au travers de 14 filtres (10 nm d'épaisseur) pour reconstruire le spectre d'émission. Pour chaque mesure, deux régions différentes sont analysées afin d'assurer la reproductibilité de la mesure. Les niveaux de FRET sont estimés par le rapport (585/525) entre la fluorescence à 585 nm (pic d'émission de l'accepteur Cy3) et la fluorescence à 525 nm (pic d'émission du donneur GFP).

2) Résultats

- La sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ couplée au Cy3 (figure 4a) est aussi active que la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ sur la régulation des canaux $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ exprimés dans des ovocytes de xénope (Figure 4b).

5 - L'injection de la protéine Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ ou GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ ou bien de l'ADNc codant pour ladite protéine, seul(e) ou en combinaison, résulte dans l'émission d'un signal de fluorescence élevé au niveau de la membrane plasmique (Figure 5a).

 L'analyse de l'émission de fluorescence entre 500 et 640 nm, après
10 excitation à 488 nm (figure 5b), montre que GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ produit un signal élevé avec un maximum à 525 nm alors que Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ seul est peu excité et produit un signal faible avec un maximum à 585 nm. Lorsque les deux protéines sont dans les ovocytes, le signal émis à 525 nm diminue de façon drastique alors que celui à 585 nm augmente significativement. Ces changements sont facilement quantifiables par la
15 détermination du rapport des signaux de fluorescence à 585 nm et 525 nm ($R_f = 0,34 \pm 0,03$ pour GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ ($n=3$), $R_f = 1,9 \pm 0,10$ pour Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ ($n=3$) et $R_f = 3,9 \pm 0,22$ pour GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ + Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ ($n=7$). D'aussi grands changements résultant d'un transfert important de fluorescence, démontrent la proximité des fluorochromes GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ et Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$.

20 - L'injection de $\text{G}\beta\gamma$ dans les ovocytes contenant à la fois GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ et Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ induit une disparition rapide du transfert de fluorescence (figure 6). Par comparaison, l'injection de $\text{G}\beta\gamma$ est sans effet dans les cellules contenant uniquement GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ ou Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$.

 Le rapport final des signaux de fluorescence ($0,82 \pm 0,06$, $n=7$) est
25 de l'ordre de celui observé dans les ovocytes contenant uniquement GFP- $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$ ou Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ indiquant que la dissociation du canal de Cy3- $\text{Ca}_v\beta_3$ est importante (figure 7). Par comparaison, l'injection de $\text{G}\beta\gamma$ inactivé par la chaleur est sans effet ($R_f = 3,74 \pm 0,4$, $n=3$).

 Ces résultats démontrent que $\text{G}\beta\gamma$ est aussi capable de déplacer *ex*
30 *vivo* la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ de son site de liaison au canal $\text{Ca}_v\alpha_{2.1}$.

EXEMPLE 4 : CONSTRUCTION D'UN BIOCAPTEUR POUR MESURER L'ACTIVITE DES PROTEINES G PAR LA TECHNIQUE DE FRET

Une protéine chimérique contenant un fluorophore donneur de fluorescence (EGFP) à son extrémité NH₂ et un fluorophore accepteur de fluorescence (CFP) à son extrémité COOH est construite à partir du vecteur pEYFPmemb (CLONTECH). Ce vecteur présente l'avantage de posséder :

- une séquence GAP-43 qui permet un ancrage de la chimère à la membrane plasmique *via* son extrémité NH₂. L'ancrage à la membrane présente l'intérêt d'une part de maintenir la protéine à la membrane et d'autre part d'augmenter la probabilité de rencontre entre la protéine chimère et son ligand Gβγ qui est lui-même ancré à la membrane par une liaison de type palmitoylation, et

- une séquence EYFP en aval de GAP-43.

La construction est réalisée en deux étapes :

- 1^{ère} étape de clonage :

Le fragment d'ADN codant pour le domaine *GK-like* de la sous-unité β (Hanlon *et al.*, FEBS, 1999, 445, 366-370) fusionné à la boucle I-II de la sous-unité α₁ est amplifié par PCR à partir du plasmide pcDNA3-Ca_vβ3-I-II_{2.1} (exemple 1) puis il est cloné en 3' du gène EYFP.

De manière plus précise, l'amplification PCR est réalisée à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

BsiWI PvuI

- 5'- AGCCGTACGCGATCGCATCTCTAGCCAAGCAGAAGCAAA - 3' (SEQ ID NO: 6)

HpaI SpeI

5'- CCCGTTAACCCCACTAGTCTGAGTTTGTACCATGCGACGGAT-3' (SEQ ID NO: 7)

Le produit PCR obtenu est cloné entre les sites *BsiWI* et *HpaI* du plasmide pEYFPmemb pour donner le plasmide pEYFmemChimBéta3I-II.

- 2^{ème} étape de clonage :

L'ADNc codant pour l'ECF est amplifié par PCR puis cloné dans le plasmide précédent, en 3' de l'insert β3-I-II.

De manière plus précise, l'ECFP est amplifiée par PCR à partir du vecteur pECFP (Clontech), à l'aide des amorces sens et anti-sens suivantes :

26,

Spe I

- 5'- GGGACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG- 3'(SEQ ID NO: 8)

Hpa I

- 5'- CCCGTTAACTGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGT-3' (SEQ ID NO: 9)

5 Le produit PCR obtenu est cloné entre les sites *Spe I* et *Hpa I* du plasmide pEYFmemChimBéta3I-II pour donner le plasmide pCHIC correspondant à la séquence SEQ ID NO: 10.

REVENDEICATIONS

1°) Protéine chimérique dérivée d'un canal calcique haut seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sous-unité β ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine BID, fusionné(e) à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 ou un fragment de celle-ci incluant au moins le domaine AID.

2°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une sous-unité β fusionnée à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

3°) Protéine chimérique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par le domaine *GK-like* d'une sous-unité β fusionné à son extrémité NH_2 ou COOH avec la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

4°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la sous-unité β ou son fragment et la boucle I-II ou son fragment sont séparés par un peptide espaceur.

5°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un canal calcique haut-seuil sensible aux protéines G.

6°) Protéine chimérique selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend la boucle I-II d'une sous-unité α_1 sélectionnée parmi α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} ou un fragment de celle-ci.

7°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend une sous-unité β sélectionnée dans le groupe constitué par β_1 , β_2 , β_3 et β_4 ou un fragment de celle-ci.

8°) Protéine chimérique variant issue d'une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation d'au moins un acide aminé dans les séquences de la dite sous-unité β et/ou de la boucle I-II d'une sous-unité α_1 .

9°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite mutation modifie l'affinité de la sous-unité β pour le fragment de la boucle I-II de la sous-unité α et/ou réciproquement.

5 10°) Protéine chimérique variant selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que lesdites mutations sont sélectionnées parmi les mutations suivantes du domaine AID de la boucle I-II de la sous-unité α_1 : Q383A, Q384A, E386D, E386S, L389H, G391R, Y392S, Y392F, W395A, I396A et E400A.

10 11°) Protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est couplée, de préférence de manière covalente, à au moins un marqueur approprié permettant la détection et/ou la purification et/ou l'immobilisation de ladite protéine.

12°) Protéine chimérique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend un fluorophore accepteur ou donneur respectivement à son extrémité NH_2 et/ou COOH .

15 13°) Protéine chimérique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le fluorophore accepteur est la protéine fluorescente CFP ou BFP et le fluorophore donneur est la protéine fluorescente GFP ou YFP.

20 14°) Peptide, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'au moins 7 acides aminés de la séquence de la protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 situés à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

25 15°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou un peptide selon la revendication 14.

30 16°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences codant pour une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou un peptide selon la revendication 14, et les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

17°) Sondes et amorces, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'environ 10 à 30 nucléotides correspondant à celle située à la jonction de la sous-unité β et de la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou de leurs fragments tels que définis à la revendication 1.

5 18°) Amorces aptes à amplifier la sous-unité β et/ou la boucle I-II de la sous-unité α_1 d'un canal calcique ou leurs fragments tels que définis à la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 7, 8 et 9.

10 19°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un insert sélectionné dans le groupe constitué par les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16.

20°) Vecteur recombinant selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur d'expression eucaryote présentant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO:
15 10.

21°) Cellules modifiées par un vecteur recombinant selon la revendication 19 ou 20, par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16 ou par une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

20 22°) Cellules modifiées selon la revendication 21, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules eucaryotes.

23°) Cellules modifiées selon la revendication 21 ou la revendication 22, caractérisées en ce qu'elles expriment au moins un récepteur capable de se lier aux protéines G.

25 24°) Mammifère transgénique non-humain, caractérisé en ce que tout ou partie de ses cellules sont transformées par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 16.

30 25°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains

selon la revendication 24, pour l'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

26°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'agonistes et/ou d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G.

27°) Utilisation d'un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24 pour le criblage d'antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil.

28°) Méthode d'étude des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₁) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé au protéine G selon la revendication 23,

b₁) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur couplé aux protéine G, par tout moyen approprié, et

c₁) la détermination, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans lesdites cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$.

29°) Méthode de criblage d'agonistes/d'antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₂) la culture de cellules modifiées exprimant une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible aux protéines G et un récepteur couplé aux protéines G selon la revendication 23,

b₂) la transduction d'un signal par l'intermédiaire dudit récepteur
5 couplé aux protéines G, par tout moyen approprié,

c₂) la détermination comparative, par tout moyen approprié, de la proportion de ladite protéine chimérique exprimée dans les cellules qui est liée à une sous-unité G $\beta\gamma$, avant et après la mise en contact desdites cellules en b₂) avec une molécule à tester, et

10 d₂) l'identification des molécules agonistes/antagonistes des voies de signalisation et de régulation cellulaires dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G, correspondant à celles capables respectivement d'augmenter et de diminuer la concentration cellulaire en sous-unités G $\beta\gamma$ libres.

30°) Méthode selon la revendication 28 ou la revendication 29,
15 caractérisée en ce que lesdites cellules modifiées en a₁) ou en a₂) expriment une protéine chimérique couplée, à ses extrémités NH₂ et COOH, respectivement à un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur de fluorescence et ladite détermination en c₁) ou en c₂) est effectuée par la technique de transfert de fluorescence (FRET).

31°) Méthode de criblage d'antagonistes de l'interaction entre les
20 sous-unités α_1 et β des canaux calciques haut-seuil, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les étapes suivantes :

a₃) la mise en contact d'une molécule à tester avec une protéine chimérique issue d'un canal calcique sensible ou insensible aux protéines G selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et avec un peptide comprenant le domaine AID
25 d'une sous-unité α_1 insensible aux protéines G,

b₃) la mesure, par tout moyen approprié, de la liaison de ladite protéine chimérique audit peptide, et

c₃) l'identification des antagonistes de l'interaction entre les sous-unités α_1 et β , correspondant à ceux avec lesquels on observe une liaison de ladite protéine chimérique audit peptide.

5 32°) Méthode de criblage selon la revendication 31, caractérisée en ce que ledit peptide comprenant le domaine AID est immobilisé sur un support solide et ladite protéine chimérique est une protéine chimérique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13.

10 33°) Trousse pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 28 à 32, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un produit sélectionné dans le groupe constitué par les protéines chimériques selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, les molécules d'acides nucléiques selon la revendication 16, les vecteurs recombinants selon la revendication 19 ou la revendication 20, les cellules modifiées selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 et les mammifères transgéniques non-humains selon la revendication 24.

1/13

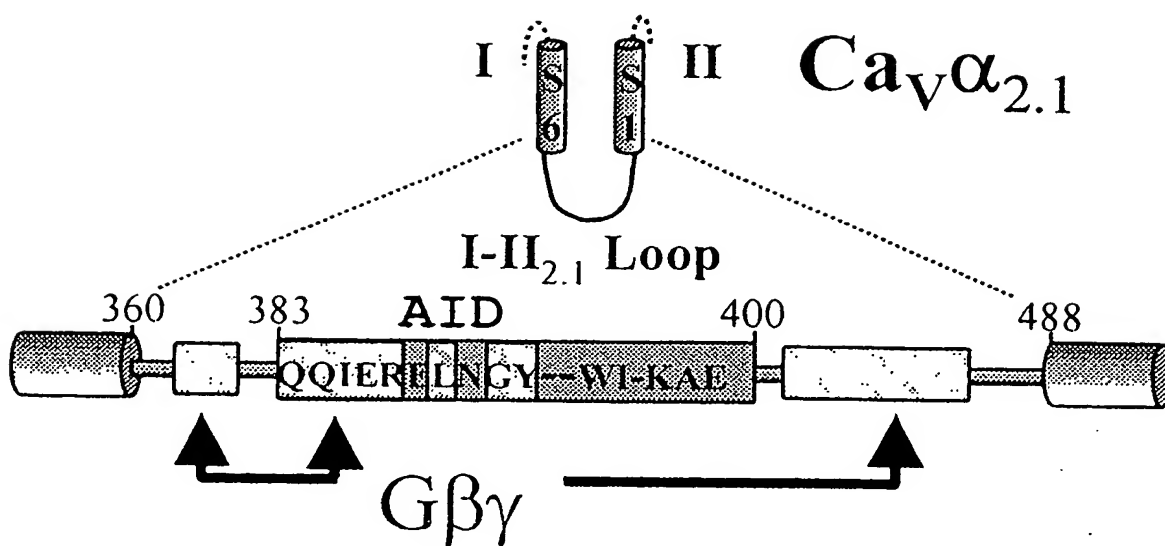


Figure 1

2/13

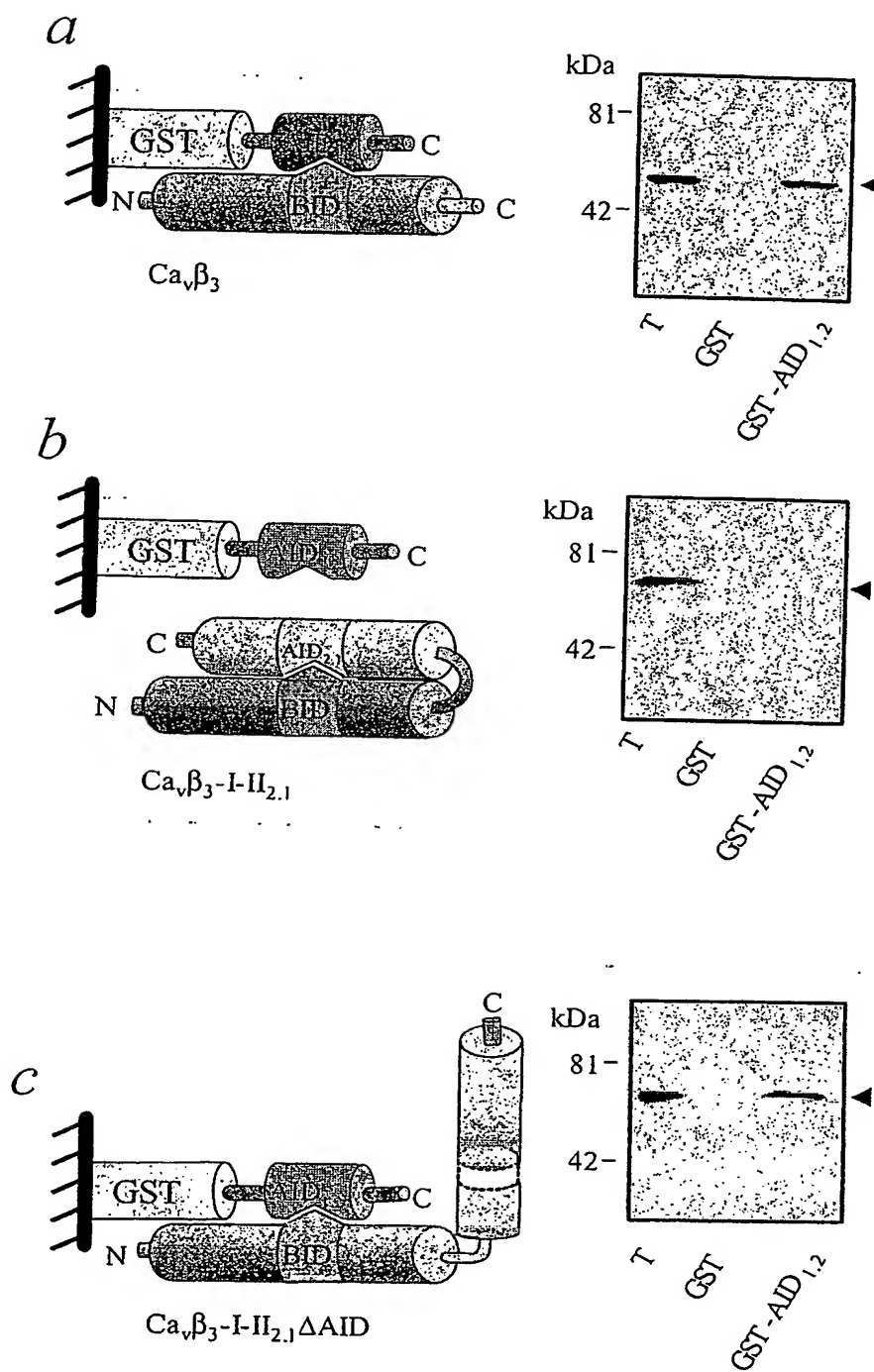


Figure 2

3/13

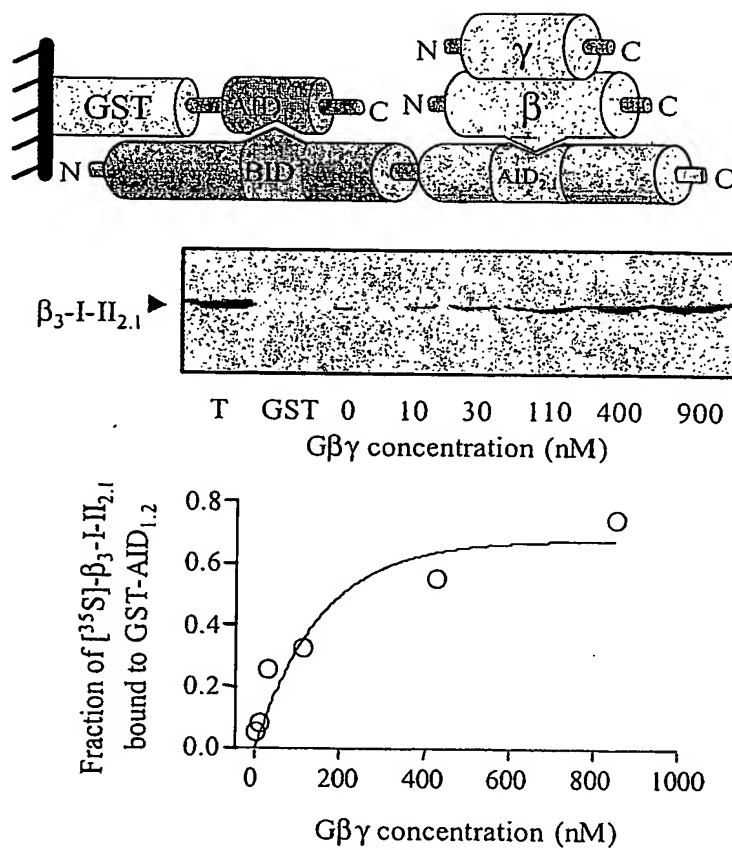


Figure 3

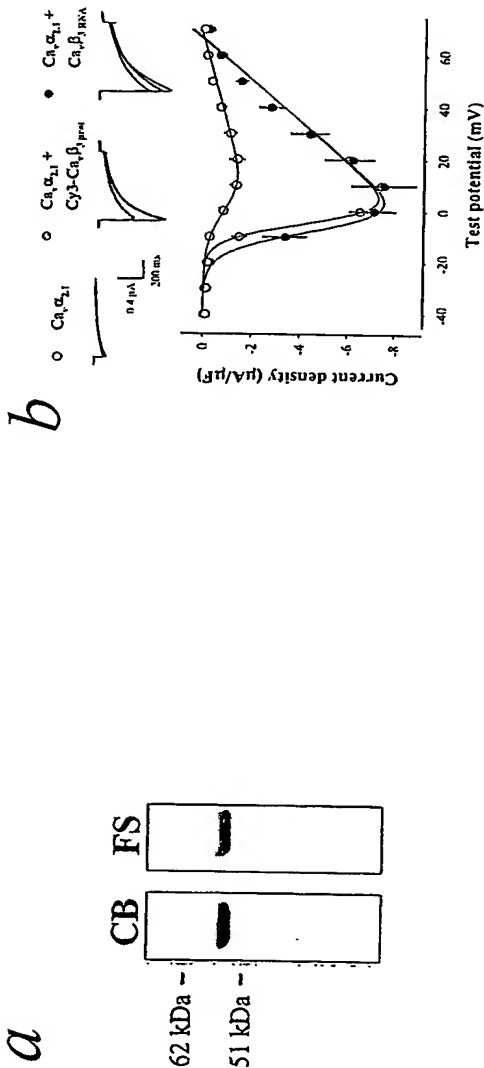


Figure 4

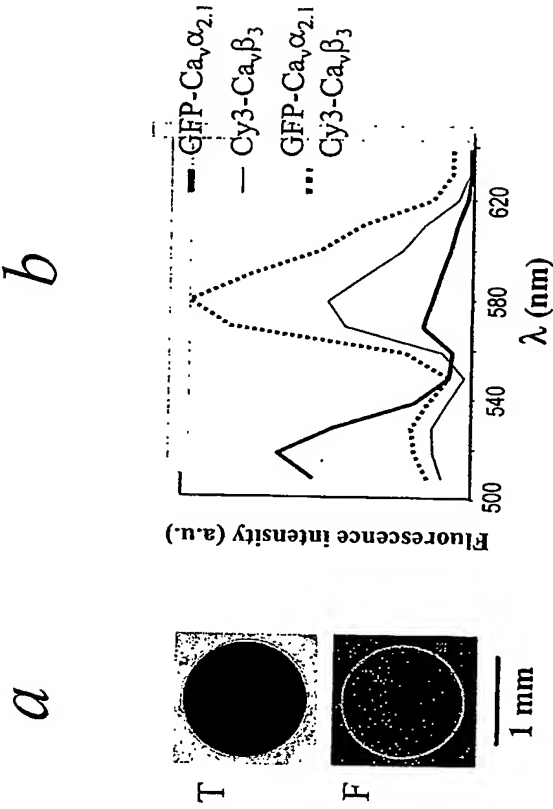


Figure 5

6/13

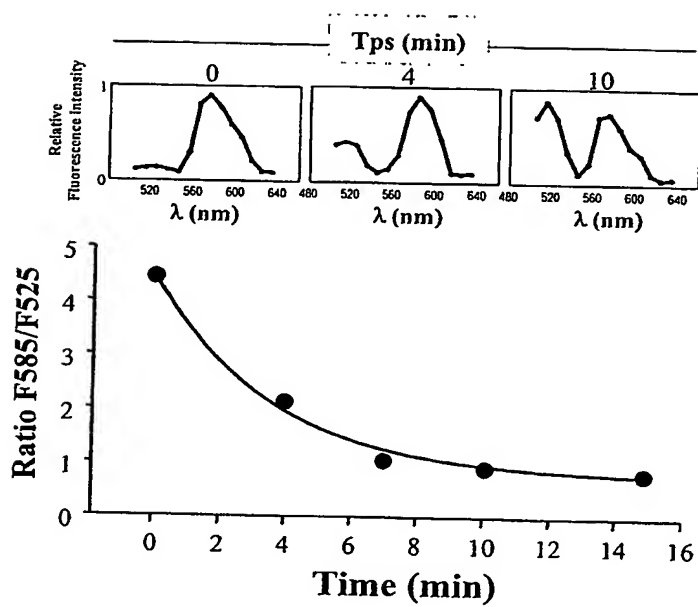


Figure 6

7/13

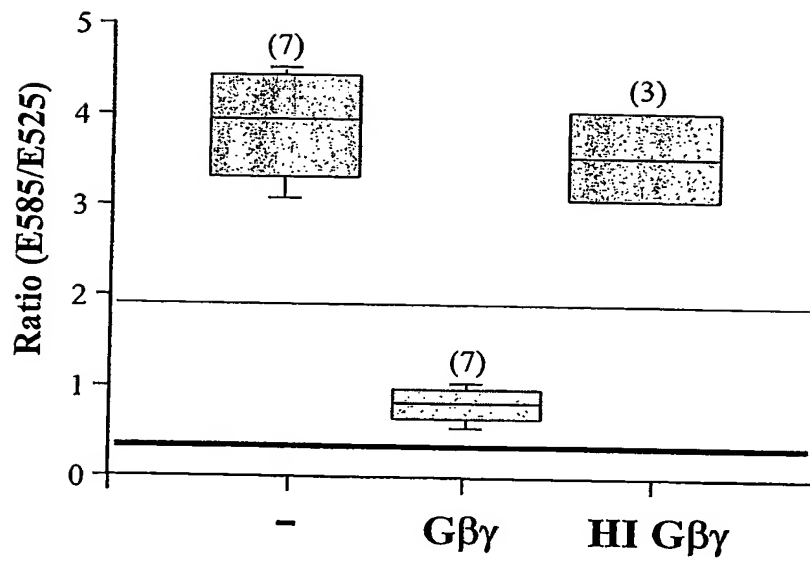


Figure 7

8/13

pcDNA3-Ca β 3-I-II2.1 (SEQ ID NO: 5)

```

1  ATGGATGACG ACTCCTACGT GCCCGGGTTT GAGGACTCGG AGGCGGGTTC
51 AGCCGACTCC TACACCAGCC GCCCCTCTCT GGACTCAGAC GTTTCCTTGG
101 AGGAGGACCG GGAGAGTGCC CGGCGAGAAG TGGAGAGTCA GGCTCAGCAG
151 CAGCTGGAAA GAGCCAAGCA CAAACCTGTG GCATTTGCTG TGAGGACCAA
201 TGTCAGCTAC TGTGGAGTTC TGGATGAGGA ATGCCAGTC CAGGGCTCTG
251 GAGTCAACTT CGAGGCCAAA GATTTTCTGC ACATTAAAGA GAAGTACAGC
301 AATGACTGGT GGATCGGGAG GCTAGTGAAA GAAGGTGGCG ATATTGCCTT
351 CATCCCCAGC CCCCACGCC TGGAGAGCAT CCGGCTCAAA CAGGAACAGA
401 AGGCCAGGAG ATCCGGAAC CCTTCCAGCC TGAGTGACAT TGGCAACCGA
451 CGTTCCCTCT CTCCATCTCT AGCCAAGCAG AAGCAAAAGC AGGCGGAACA
501 TGTCCCCCGG TATGATGTGG TGCCCTCCAT GCGGCTGTG GTGCTGGTGG
551 GACCTCTCTT GAAAGGTTAT GAGGTCACAG ACATGATGCA GAAGGCTCTC
601 TTCGACTTCC TTAAACACAG GTTTGATGGC AGGATCTCCA TCACCCGCGT
651 CACGGCTGAC CTCTCACTGG CCAAGCGCTC TGTGCTCAAC AATCCTGGCA
701 AGAGGACCAT CATCGAGCGC TCTTCTGCCC GCTCCAGCAT TGCTGAGGTG
751 CAGAGTGAGA TTGAGCGCAT ATTCGAGCTG GCCAAATCCC GCGAGCTAGT
801 GGTGTTGGAT GCTGACACCA TCAACCACCC AGCACAGCTA GCCAAGACCT
851 CACTGGCCCC CATCATCGTC TTCGTCAAAG TGTCTCGCC AAAGGTACTG
901 CAGCGACTGA TCCGCTCCAG GGGGAAGTCC CAGATGAAGC ACCTCACTGT
951 ACAGATGATG GCATATGATA AGCTGGTTCA GTGCCACCT GAGTCATTTG
1001 ATGTGATTCT GGATGAGAAC CAGCTGGACG ACGCCTGTGA GCACCTAGCT
1051 GAATACCTAG AGGTTTACTG GCGCGTACC CACCACCAG CACCGGGCCC
1101 CGGGATGCTG GGTCCGCCCA GTGCCATCCC TGGACTTCAG AACCAGCAGC
1151 TGCTGGGGGA GCGAGGTGAG GAGCATTCAC CCCTGGAGCG GGACGTTTG
1201 ATGCCCTCGG ATGAGGCCAG TGAGAGCTCC CGCCAGGCTT GGACCGGATC
1251 TTCACAGCGC AGCTCCCGCC ATCTGGAGGA GGACTATGCA GATGCCTACC
1301 AGGACCTGTA CCAGCCTCAC CGTCAACACA CCTCGGGGCT ACCCAGTGCT
1351 AACGGGCATG ACCCCCAAGA CCGGCTCCTA GCCCAGGACT CGGAGCATGA
1401 CCACAATGAC CGGAAGTGGC AGCGTAACCG GCCTTGGCCT AAGGACAGCT
1451 ACGAATTCGC CAAAGAAAGG GAGCGGGTGG AGAACCAGCG CGCATTCCTG
1501 AAGCTGCGGC GGCAGCAGCA GATTGAACGC GAGCTCAACG GGTACATGGA
1551 GTGGATCTCA AAAGCAGAAG AGGTGATCCT CGCAGAGGAC GAGACCGACG
1601 TGGAGCAGAG ACATCCCTTT GATGGAGCTC TGGGAGAGC CACTATCAAG
1651 AAGAGCAAGA CGGACCTGCT CCACCCAGAG GAGGCGGAGG ATCAGCTGGC
1701 CGACATCGCC TCCGTGGGGT CTCCCTTTGC CCGAGCCAGC ATTAAGAGTG
1751 CCAAGCTGGA GAACTCGAGT TTTTTCACA AAAAAGAGAG GAGAATGCGT
1801 TTCTACATCC GTCGCATGGT CAAAACCTAG TAAGAATTCT GCAGATATCC
1851 ATCACACTGG CGGCCGCTCG AGCATGCATC TAGAGGGCCC TATTCTATAG
1901 TGTCACCTAA ATGCTAGAGC TCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG
1951 TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCTTGG
2001 AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG
2051 CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGCAGGA
2101 CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG
2151 TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG
2201 TATCCCCACG CGCCCTGTAG CGGCGCATTG AGCGCGCGCG GTGTGGTGGT
2251 TACGCGCAGC GTGACCCCTA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT
2301 TCGCTTTCTT CCGTTCCTTT CTGCCCAGT TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA
2351 GCTCTAAATC GGGGCATCCC TTTAGGGTTC CGATTAGTG CTTTACGGCA
2401 CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT
2451 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT
2501 AATAGTGGAC TCTTGTTCCT AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT
2551 CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGGG GATTTGCGCC TATTGGTTAA
2601 AAAATGAGCT GATTTAACA AAATTTAACG CGAATTAATT CTGTGGAATG
2651 TGTGTGAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTCCCCAGG CAGGCAGAAG
2701 TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT GGAAAGTCCC

```

Figure 8a

9/13

```

2751 CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
2801 GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC ATCCCGCCCC TAACTCCGCC
2851 CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG
2901 CAGAGGCCGA GGCCGCCTCT GCCTCTGAGC TATTCCAGAA GTAGTGAGGA
2951 GGCTTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA AAGCTCCCGG GAGCTTGAT
3001 ATCCATTTTC GGATCTGATC AAGAGACAGG ATGAGGATCG TTTTCGCATGA
3051 TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCCT CGGCCGCTTG GGTGGAGAGG
3101 CTATTCCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT CTGATGCCGC
3151 CGTGTTCCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTTT GTCAAGACCG
3201 ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAAGTGCAGG ACGAGGCAGC GCGGCTATCG
3251 TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG ACGTTGTCAC
3301 TGAAGCGGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG GGGCAGGATC
3351 TCCTGTCAATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT CATGGCTGAT
3401 GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC CATTCGACCA
3451 CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCACG TACTCGGATG GAAGCCGGTC
3501 TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CGCGCCAGCC
3551 GAACTGTTCG CCAGGCTCAA GCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT
3601 CGTGACCCAT GGCGATGCCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG GAAATGGCC
3651 GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC GGACCCTAT
3701 CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGGCGCGA
3751 ATGGGCTGAC CGCTTCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCCG
3801 AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG AGCGGGACTC
3851 TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC ATCAGGAGAT
3901 TTCGATTCCA CCGCCGCCCT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT
3951 CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT
4001 TCTTCGCCCC CCCCAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA
4051 AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC
4101 TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGTATAC
4151 CGTCGACCTC TAGCTAGAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCTC
4201 GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG
4251 CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTAA
4301 TTGCGTTGCG CTCACTGCCC GCTTTCCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG
4351 CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGG AGAGCGGTT TGCGTATTGG
4401 GCGCTCTTCC GCTTCTCTCG TCACTGACTC GCTGCGCTCG GCTGTTCCGC
4451 TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA
4501 GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA
4551 GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC CATAGGCTCC
4601 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA
4651 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT
4701 CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCT
4751 TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC AATGCTCACG CTGTAGGTAT
4801 CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC
4851 CCCCGTTTCC CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATC CGTCTTGAGT
4901 CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC
4951 AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG
5001 GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
5051 TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC
5101 AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT
5151 TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG
5201 GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG
5251 AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG
5301 TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
5351 AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA
5401 TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACACGA TACGGGAGGG
5451 CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCCGAGAC CCACGCTCAC
5501 CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC

```

Figure 8b

10/13

```

5551 AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG
5601 CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
5651 TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT
5701 TCATTTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT
5751 GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTTCAGAA
5801 GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT
5851 TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA
5901 CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
5951 GCGGCGGCTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA
6001 GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT
6051 ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT
6101 CTTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA
6151 AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT
6201 ACTCATACTC TTCTTTTTTC AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT
6251 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA
6301 GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCGACGGATC
6351 GGGAGATCTC CCGATCCCCT ATGGTCGACT CTCAGTACAA TCTGCTCTGA
6401 TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATCTGCTCCC TGCTTGTGTG TTGGAGGTCG
6451 CTGAGTAGTG CGCGAGCAA ATTTAAGCTA CAACAAGGCA AGGCTTGACC
6501 GACAATTGCA TGAAGAATCT GCTTAGGGTT AGGCGTTTTC CGCTGCTTCG
6551 CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
6601 AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC
6651 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
6701 CCCCCGCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCACATA GTAACGCCAA
6751 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
6801 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
6851 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT
6901 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
6951 ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
7001 TGACTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATGACGTC AATGGGAGTT
7051 TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTGC TAACAACCTC
7101 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
7151 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
7201 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGA CC

```

Figure 8c

11/13

pCHIC (SEQ ID NO: 10)

```

1 ATGCTGTGCT GTATGAGAAG AACCAAACAG GTTGAAAAGA ATGATGAGGA
51 CAAAAGATC ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTGC
101 CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG
151 TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT
201 CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA
251 CCTTCGGCTA CGGCCTGCAG TGCTTCGCCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
301 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG
351 CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA
401 AGTTCGAGGG CGACACCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC
451 TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA
501 CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG
551 TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC
601 GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC
651 CGACAACCAC TACCTGAGCT ACCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
701 AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC GCCCGGGATC
751 ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACGCGATC GCATCTCTAG CCAAGCAGAA
801 GCAAAAGCAG GCGGAACATG TCCCCCGTA TGATGTGGTG CCCTCCATGC
851 GGCCTGTGGT GCTGGTGGGA CCCTCTCTGA AAGGTTATGA GGTACAGAC
901 ATGATGCAGA AGGCTCTCTT CGACTTCCTT AAACACAGGT TTGATGGCAG
951 GATCTCCATC ACCCGCGTCA CGGCTGACCT CTCACTGGCC AAGCGCTCTG
1001 TGCTCAACAA TCCTGGCAAG AGGACCATCA TCGAGCGCTC TTCTGCCCGC
1051 TCCAGCATTG CTGAGGTGCA GAGTGAGATT GAGCGCATAT TCGAGCTGGC
1101 CAAATCCCTG CAGCTAGTGG TGTGGATGC TGACACCATC AACCACCAG
1151 CACAGCTAGC CAAGACCTCA CTGGCCCCCA TCATCGTCTT CGTCAAAGTG
1201 TCCTCGCCAA AGGTACTGCA GCGACTGATC CGCTCCAGGG GGAAGTCCCA
1251 GATGAAGCAC CTCACTGTAC AGATGATGGC ATATGATAAG CTGGTTCAGT
1301 GCCCACCTGA GTCAATTGAT GTGATTCTGG ATGAGAACCA GCTGGACGAC
1351 GCCTGTGAGC ACCTAGCTGA ATACCTAGAG GTTTACTGGC GCGTACCCA
1401 CCACCCAGCA CCGGGCCCCG GGATGCTGGG TCCGCCAGT GCCATCCCTG
1451 GACTTCAGAA CCAGCAGCTG CTGGGGGAGC GAGGTGAGGA GCATTCACCC
1501 CTGGAGCGGG ACAGTTTGAT GCCCTCGGAT GAGGCCAGTG AGAGCTCCCG
1551 CCAGGCCTGG ACCGGATCTT CACAGCGCAG CTCCCGCCAT CTGGAGGAGG
1601 ACTATGCAGA TGCCTACCAG GACCTGTACC AGCCTCACC GTCACACACC
1651 TCGGGGCTAC CCAGTGCTAA CGGGCATGAC CCCCAAGACC GGCTCCTAGC
1701 CCAGGACTCG GAGCATGACC ACAATGACCG GAACTGGCAG CGTAACCGGC
1751 CTTGGCCTAA GGACAGCTAC GAATTCGCCA AAGAAAGGGA GCGGGTGGAG
1801 AACC GGCGCG CATTCCTGAA GCTGCGGCGG CAGCAGCAGA TTGAACGCGA
1851 GCTCAACGGG TACATGGAGT GGATCTCAA AGCAGAAGAG GTGATCCTCG
1901 CAGAGGACGA GACCGACGTG GAGCAGAGAC ATCCCTTTGA TGGAGCTCTG
1951 CGGAGAGCCA CTATCAAGAA GAGCAAGACG GACCTGCTCC ACCCAGAGGA
2001 GGC GGAGGAT CAGCTGGCCG ACATCGCCTC CGTGGGGTCT CCCTTTGCC
2051 GAGCCAGCAT TAAAAGTGCC AAGCTGGAGA ACTCGAGTTT TTCCACAAA
2101 AAAGAGAGGA GAATGCGTTT CTACATCCGT CGCATGGTCA AACTCAGAC
2151 TAGTATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCATCC
2201 TGGTCGAGCT GGACGGCGAC GTAAACGGCC ACAGGTTTCAG CGTGTCCGGC
2251 GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG CTGACCCTGA AGTTCATCTG
2301 CACCACGGG AAGCTGCCCG TGCCCTGGCC CACCTCGTG ACCACCCTGA
2351 CCTGGGGCGT GCAGTGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC
2401 GACTTCTTCA AGTCCGCCAT CCCC GAAGG TACGTCCAGG AGCGACCAT
2451 CTTCTTCAAG GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCC
2501 AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATCGAGC TGAAGGGCAT CGACTTCAAG
2551 GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC ATATCAGCCA
2601 CAACGTCTAT ATCACC GCGG ACAAGCAGAA GAACGGCATC AAGGCCAACT
2651 TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC
2701 TACCAGCAGA ACACCCCAT CGGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA

```

Figure 9a

12/13

2751 CCACTACCTG AGCACCCAGT CCGCCCTGAG CAAAGACCCC AAGGAGAAGC
 2801 GCGATCACAT GGTCCCTGCTG GAGTTCGTGA CCGCCGCCGG GATCACTCTC
 2851 GGCAGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA
 2901 GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACGTGA TTCTAGTTGT
 2951 GGTTCGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAA GCGGTAAATT GTAAGCGTTA
 3001 ATATTTTGTG AAAATTCGCG TTAATTTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT
 3051 AACC AATAGG CCGAAATCGG CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGAATAGAC
 3101 CGAGATAGGG TTGAGTGTG TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA
 3151 AGAACGTGGA CTCCAACGTC AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT
 3201 GGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTG
 3251 CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT
 3301 GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA
 3351 GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA GCGGTCACGC TGCGCGTAAC
 3401 CACCACACCC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TCAGGTGGCA
 3451 CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
 3501 CATTC AATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA
 3551 ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTCCTGAGGC GGAAAGAACC AGCTGTGGAA
 3601 TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA
 3651 GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCAGGTG TGGAAAGTCC
 3701 CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
 3751 AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAAC TCCGCC CATCCCGCCC CTAAC TCCGC
 3801 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT
 3851 GCAGAGGCCG AGGCCGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
 3901 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AGATCGATCA AGAGACAGGA
 3951 TGAGGATCGT TTCGCATGAT TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC
 4001 GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCGGCTA TGACTGGGCA CAACAGACAA
 4051 TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCGGC TGTACGCGCA GGGGCGCCCCG
 4101 GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAAGA
 4151 CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CTTGCGCAG
 4201 CTGTGCTCGA CGTTGTCACT GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGGC
 4251 GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCATCT CACCTTGCTC CTGCCGAGAA
 4301 AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTGATCCGG
 4351 CTACCTGCCC ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT
 4401 ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
 4451 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTTCG CAGGCTCAAG GCGAGCATGC
 4501 CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCGT CTGCGGAAT
 4551 ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGGCT
 4601 GGGTGTGGCG GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG
 4651 CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGCTGACC GCTTCCTCGT GCTTTACGGT
 4701 ATCGCCGCTC CCGATTGCA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA
 4751 GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTGCAA ATGACCGACC AAGCGACGCC
 4801 CAACCTGCCA TCACGAGATT TCGATTCCAC CGCCGCCCTT TATGAAAGGT
 4851 TGGGCTTCGG AATCGTTTTT CCGGACGCGG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC
 4901 GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTGCCCCAC CCTAGGGGGA GGCTAACTGA
 4951 AACACGGAAG GAGACAATAC CGGAAGGAAC CCGCGCTATG ACGGCAATAA
 5001 AAAGACAGAA TAAAACGCAC GGTGTTGGGT CGTTTGTTCA TAAACGCGGG
 5051 GTTCGGTCCC AGGGCTGGCA CTCTGTCGAT ACCCCACCGA GACCCCATTTG
 5101 GGGCCAATAC GCCCGCGTTT CTTCCTTTTT CCCACCCAC CCCCCAAGTT
 5151 CGGGTGAAGG CCCAGGGCTC GCAGGCCAAC TCGGGGCGGC AGGCCCTGCC
 5201 ATAGCCTCAG GTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACTTCATT
 5251 TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA
 5301 AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA
 5351 AAGATCAAAG GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG
 5401 CTTGCAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGATC
 5451 AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG
 5501 ATACCAATA CTGTCCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA

Figure 9b

13/13

```

5551 GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACCTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG
5601 TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA
5651 CGATAGTTAC CGGATAAGGC GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGGTTCGTG
5701 CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA CACCGAAGTG AGATACCTAC
5751 AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC
5801 AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCGGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
5851 TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTCGGG TTTCGCCACC
5901 TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA
5951 TGGAAAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTTA CGGTTCCCTG CCTTTTGCTG
6001 GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCCTGCGTT ATCCCTGAT TCTGTGGATA
6051 ACCGTATTAC CGCCATGCAT TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC
6101 ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA
6151 ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA
6201 ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTCC ATTGACGTCA
6251 ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
6301 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
6351 GCCTGGCATT ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA
6401 GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC
6451 AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT
6501 CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
6551 GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
6601 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC
6651 CGTCAGATCC GCTAGCGCTA CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA
6701 ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG GATCCACCGG TCGCCACC

```

Figure 9c

S263PCT87.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Commissariat à l'Energie Atomique
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
DE WAARD, Michel
DUPUIS, Alain
GRUNWALD, Didier
SANDOZ, Guillaume

<120> Protéine chimérique pour le criblage d'agonistes et d'antagonistes des
voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs couplés aux
protéines G

<130> 263PCT87

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 1

tttggtacca tggatgacga ctctacgtg cccgggtttg aggactcgga ggcggggtt 58

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

s263PCT87.ST25

<400> 2
 gcggaattcg tagctgtcct taggccaagg ccggttacgc tgccagtt 48

<210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> amorce

<400> 3
 ggggaattcg ccaaagaaag ggagcgggtg gagaac 36

<210> 4
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> amorce

<400> 4
 tttgaattct tactgagttt tgaccatgcg acggatgtag aaacgcattc t 51

<210> 5
 <211> 7242
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> plasmide recombinant

<400> 5
 atggatgacg actcctacgt gcccgggttt gaggactcgg aggcgggttc agccgactcc 60
 tacaccagc gccctctctt ggactcagac gtttccttgg aggaggaccg ggagagtgcc 120
 cggcgagaag tggagagtca ggctcagcag cagctggaaa gagccaagca caaacctgtg 180
 gcatttgctg tgaggaccaa tgtcagctac tgtggagtgc tggatgagga atgcccagtc 240
 cagggtctg gagtcaactt cgaggccaaa gatcttctgc acattaaaga gaagtacagc 300
 aatgactggg ggatcgggag gctagtgaag gaaggtggcg atattgcctt catccccagc 360
 cccaacgcc tggagagcat ccggctcaaa caggaacaga aggccaggag atccgggaac 420

s263PCT87.ST25

ccttccagcc	tgagtgacat	tggcaaccga	cgttccccctc	ctccatctct	agccaagcag	480
aagcaaaagc	aggcggaaca	tgtccccccg	tatgatgtgg	tgccctccat	gcggcctgtg	540
gtgctggtgg	gaccctctct	gaaaggttat	gaggtcacag	acatgatgca	gaaggctctc	600
ttcgacttcc	ttaaacacag	gtttgatggc	aggatctcca	tcaccgcgt	cacggctgac	660
ctctcactgg	ccaagcgctc	tgtgctcaac	aatcctggca	agaggaccat	catcgagcgc	720
tcttctgccc	gctccagcat	tgctgaggtg	cagagtgaga	ttgagcgc	atcgagctg	780
gccaaatccc	tgcagctagt	ggtgttggt	gctgacacca	tcaaccacc	agcacagcta	840
gccaagacct	cactggcccc	catcatcgtc	ttcgtcaaag	tgtcctcgcc	aaaggctactg	900
cagcgactga	tccgctccag	ggggaagtcc	cagatgaagc	acctcactgt	acagatgatg	960
gcatatgata	agctggttca	gtgcccacct	gagtcatttg	atgtgattct	ggatgagaac	1020
cagctggacg	acgcctgtga	gcacctagct	gaatacctag	aggtttactg	gcgcgctacc	1080
caccacccag	caccgggccc	cgggatgctg	ggtccgcca	gtgccatccc	tggacttcag	1140
aaccagcagc	tgctggggga	gcgaggtgag	gagcattcac	ccctggagcg	ggacagtttg	1200
atgccctcgg	atgaggccag	tgagagctcc	cgccaggcct	ggaccggatc	ttcacagcgc	1260
agctcccgcc	atctggagga	ggactatgca	gatgcctacc	aggacctgta	ccagcctcac	1320
cgtcaacaca	cctcggggct	accagtgct	aacgggcatg	acccccaaga	ccggctccta	1380
gcccaggact	cggagcatga	ccacaatgac	cggaaactggc	agcgtaaccg	gccttggcct	1440
aaggacagct	acgaattcgc	caaagaaagg	gagcgggtgg	agaaccggcg	cgcattcctg	1500
aagctgcggc	ggcagcagca	gattgaacgc	gagctcaacg	ggtacatgga	gtggatctca	1560
aaagcagaag	aggtgatcct	cgcagaggac	gagaccgacg	tggagcagag	acatcccttt	1620
gatggagctc	tgcggagagc	cactatcaag	aagagcaaga	cggacctgct	ccaccagag	1680
gaggcggagg	atcagctggc	cgacatcgcc	tccgtgggg	ctccctttgc	ccgagccagc	1740
attaaaagtg	ccaagctgga	gaactcgagt	tttttcaca	aaaaagagag	gagaatgcgt	1800
ttctacatcc	gtcgcattgg	caaaactcag	taagaattct	gcagatatcc	atcacactgg	1860
cggccgctcg	agcatgcac	tagagggcc	tattctatag	tgtcacctaa	atgctagagc	1920
tcgctgatca	gcctcgactg	tgccttctag	ttgccagcca	tctgttgttt	gcccctcccc	1980
cgtgccttcc	ttgacctg	aagggtgccac	tcccactgtc	ctttccta	aaaatgagga	2040
aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	ttctattctg	gggggtgggg	tggggcagga	2100
cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgcgg	tgggctctat	2160
ggcttctgag	gcggaaagaa	ccagctgggg	ctctagggg	tatccccacg	cgccctgtag	2220
cggcgcatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	2280
cgccctagcg	cccgtcctt	tcgctttctt	cccttcctt	ctcgccacgt	tcgccggctt	2340
tccccgtcaa	gctctaaatc	ggggcatccc	tttagggttc	cgatttagtg	ctttacggca	2400
cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	2460

s263PCT87.ST25

gacggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	2520
aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggt	ctattctttt	gatttataag	ggattttggg	2580
gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattaatt	2640
ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtga	aagtccccag	gctccccagg	caggcagaag	2700
tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccagggtgt	ggaaaagtccc	caggctcccc	2760
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtc	gcaaccatag	tcccgcctct	2820
aactccgccc	atccccgccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	2880
actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	2940
gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctcccgg	gagcttgtat	3000
atccattttc	ggatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	3060
tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	3120
acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	3180
ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	3240
gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	3300
tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	3360
tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	3420
gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcga	catcgcatcg	agcgagcacg	3480
tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	3540
cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgcggcg	aggatctcgt	3600
cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttcttg	3660
attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	3720
ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttcctcg	tgctttacgg	3780
tatcgccgct	ccgattcgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	3840
agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	3900
ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	3960
ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcca	ccccaaactg	4020
tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	4080
gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcacaaatgt	atcttatcat	4140
gtctgtatac	cgtcgacctc	tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	4200
gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	4260
aaagcctggg	gtgcctaattg	agtgaagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	4320
gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcc	acgcgcgggg	4380
agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	4440
gtcgttcggc	tgccggcagc	ggatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	4500

s263PCT87.ST25

gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	4560
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	4620
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	4680
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	4740
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgctg	gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtagggtat	4800
ctcagttcgg	tgtaggctcg	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	4860
cccgaaccgct	gcgccttatc	cggttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggg	aagacacgac	4920
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4980
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	5040
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	5100
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	5160
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggctctgacgc	tcagtggaac	5220
gaaaactcac	gttaagggat	tttggctcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	5280
cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggtct	5340
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	5400
tccatagttg	cctgactccc	cgctcgtgtg	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	5460
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	5520
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	5580
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	5640
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggatatggct	5700
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttggtgcaaa	5760
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagtgggc	cgcagtgtta	5820
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	5880
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	5940
agttgctctt	gcccggcgctc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	6000
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	6060
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	6120
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	6180
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	6240
caggggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	6300
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tcgacggatc	gggagatctc	6360
ccgatccctt	atggtcgact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	6420
atctgctccc	tgcttgtgtg	ttggaggtcg	ctgagtagtg	cgcgagcaaa	atttaagcta	6480
caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgca	tgaagaatct	gcttaggggt	aggcgttttg	6540

s263PCT87.ST25

cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt 6600
 aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 6660
 aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa 6720
 taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 6780
 actattttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 6840
 cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct 6900
 tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga 6960
 tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa 7020
 gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa cgggactttc 7080
 caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg 7140
 aggtctatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg 7200
 aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttggtg cc 7242

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 6

agccgtacgc gatcgcatct ctagccaagc agaagcaaa

39

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 7

cccgttaacc ccactagtct gagttttgac catgcgacgg at

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

S263PCT87.ST25

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 8

gggactagta tggtagagcaa gggcgaggag ctg

33

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 9

cccgttaact gccgagagtg atcccggcgg cggt

34

<210> 10

<211> 7242

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> plasmide recombinant

<400> 10

atggatgacg actcctacgt gcccggggtt gaggactcgg aggcggggttc agccgactcc	60
tacaccagcc gccctctctt ggactcagac gtttccctgg aggaggaccg ggagagtgcc	120
cggcgagaag tggagagtca ggctcagcag cagctggaaa gagccaagca caaacctgtg	180
gcatttgctg tgaggaccaa tgtcagctac tgtggagtgc tggatgagga atgcccagtc	240
cagggctctg gagtcaactt cgaggccaaa gattttctgc acattaaaga gaagtacagc	300
aatgactggg ggatcgggag gctagtgaag gaagggtggcg atattgcctt catccccagc	360
ccccaacgcc tggagagcat ccgggtcaaa caggaacaga aggccaggag atccgggaac	420
ccttccagcc tgagtgacat tggcaaccga cgttccccctc ctccatctct agccaagcag	480
aagcaaaagc aggcggaaca tgtccccccg tatgatgtgg tgccctccat gcggcctgtg	540
gtgctgggtg gaccctctct gaaagggttat gaggtcacag acatgatgca gaaggctctc	600
ttcgacttcc ttaaacacag gtttgatggc aggatctcca tcaccgcgt cacggctgac	660
ctctcactgg ccaagcgctc tgtgctcaac aatcctggca agaggaccat catcgagcgc	720

s263PCT87.ST25

tcttctgccc gctccagcat tgctgaggtg cagagtgaga ttgagcgcat attcgagctg	780
gccaaatccc tgcagctagt ggtgttgat gctgacacca tcaaccaccc agcacagcta	840
gccaaagacct cactggcccc catcatcgtc ttcgtcaaag tgcctcgc aaaggtagtg	900
cagcgactga tccgctccag ggggaagtcc cagatgaagc acctcactgt acagatgatg	960
gcatatgata agctggttca gtgcccacct gagtcatttg atgtgattct ggatgagaac	1020
cagctggacg acgcctgtga gcacctagct gaatacctag aggtttactg gcgcgctacc	1080
caccacccag caccgggccc cgggatgctg ggtccgcccc gtgcatccc tggacttcag	1140
aaccagcagc tgctggggga gcgaggtgag gagcattcac ccctggagcg ggacagtttg	1200
atgccctcgg atgaggccag tgagagctcc cgccaggcct ggaccggatc ttcacagcgc	1260
agctcccgcc atctggagga ggactatgca gatgcctacc aggacctgta ccagcctcac	1320
cgtaacaca cctcggggct acccagtgt aacgggcatg accccaaga ccggctccta	1380
gcccaggact cggagcatga ccacaatgac cggaaactggc agcgtaacccg gccttggcct	1440
aaggacagct acgaattcgc caaagaaagg gagcgggtgg agaaccggcg cgcattcctg	1500
aagctgcggc ggcagcagca gattgaacgc gagctcaacg ggtacatgga gtggatctca	1560
aaagcagaag aggtgatcct cgcagaggac gagaccgacg tggagcagag acatcccttt	1620
gatggagctc tgcggagagc cactatcaag aagagcaaga cggacctgct ccaccagag	1680
gaggcggagg atcagctggc cgacatcgcc tccgtggggt ctccctttgc ccgagccagc	1740
attaaaagtg ccaagctgga gaactcgagt tttttccaca aaaaagagag gagaatgcgt	1800
ttctacatcc gtcgcatggt caaaactcag taagaattct gcagatatcc atcacactgg	1860
cggccgctcg agcatgcatc tagagggcc tattctatag tgtcacctaa atgctagagc	1920
tcgctgatca gcctcgaactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc	1980
cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga	2040
aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga	2100
cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat	2160
ggtttctgag gcggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag	2220
cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag	2280
cgccctagcg ccgctcctt tcgctttctt cccttcctt ctcgccacgt tcgccggctt	2340
tcccgctcaa gctctaaatc ggggcatccc tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca	2400
cctcgaccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata	2460
gacggttttt cgccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca	2520
aactggaaca acactcaacc ctatctcgggt ctattctttt gatattataag ggattttggg	2580
ggttcggcc tattgggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt	2640
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagg caggcagaag	2700
tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc	2760

s263PCT87.ST25

agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccctt	2820
aactccgccc atcccgcctt taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg	2880
actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa	2940
gtagttagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgat	3000
atccattttt ggatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga	3060
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc	3120
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc	3180
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc	3240
gcggctatcg tggctggcca cgacgggctt tccttgccga gctgtgctcg acgttgctac	3300
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc	3360
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	3420
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg	3480
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	3540
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcgct cccgacggcg aggatctcgt	3600
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttcttg	3660
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac	3720
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	3780
tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgct cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg	3840
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat	3900
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc	3960
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca ccccaacttg	4020
tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa	4080
gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcacaaatgt atcttatcat	4140
gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct	4200
gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt	4260
aaagcctggg gtgcctaatt agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc	4320
gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg	4380
agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg	4440
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca	4500
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa gccagcaaaa ggccaggaac	4560
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	4620
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg	4680
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	4740
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggat	4800

s263PCT87.ST25

ctcagttcgg	tgtagggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	4860
cccgaccgct	gcgctttatc	cggttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	4920
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4980
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	5040
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	5100
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	5160
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	5220
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	5280
cttttaaatt	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggtct	5340
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	5400
tccatagtgtg	cctgactccc	cgctcgtgtg	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	5460
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	5520
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	5580
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	5640
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcgtt	tggatggct	5700
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	5760
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	5820
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	5880
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	5940
agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	6000
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	6060
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	6120
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	6180
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	6240
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	6300
ggggttccgc	gcacattttc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tcgacggatc	gggagatctc	6360
ccgatcccct	atggctgact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	6420
atctgctccc	tgcttgtgtg	ttggaggtcg	ctgagtagtg	cgcgagcaaa	atttaagcta	6480
caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgca	tgaagaatct	gcttaggggt	aggcgttttg	6540
cgctgcttcg	cgatgtacgg	gccagatata	cgcgttgaca	ttgattattg	actagttatt	6600
aatagtaatc	aattacgggg	tcattagttc	atagcccata	tatggagttc	cgcgttacat	6660
aacttacggg	aaatggcccc	cctggctgac	cgcccaacga	cccccgccca	ttgacgtcaa	6720
taatgacgta	tgttcccata	gtaacgccaa	tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	6780
actattttacg	gtaaaactgcc	cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	6840

s263PCT87.ST25

cccctattga	cgtcaatgac	ggtaaatggc	ccgcctggca	ttatgcccag	tacatgacct	6900
tatgggactt	tcctacttgg	cagtacatct	acgtattagt	catcgctatt	accatggtga	6960
tgcggttttg	gcagtacatc	aatgggctg	gatagcggtt	tgactcacgg	ggatttccaa	7020
gtctccaccc	cattgacgtc	aatgggagtt	tgttttggca	ccaaaatcaa	cgggactttc	7080
caaaatgtcg	taacaactcc	gccccattga	cgcaaattgg	cggtaggcgt	gtacggtggg	7140
aggcttatat	aagcagagct	ctctggctaa	ctagagaacc	cactgcttac	tggcttatcg	7200
aaattaatac	gactcactat	agggagaccc	aagcttggtg	cc		7242

1/13

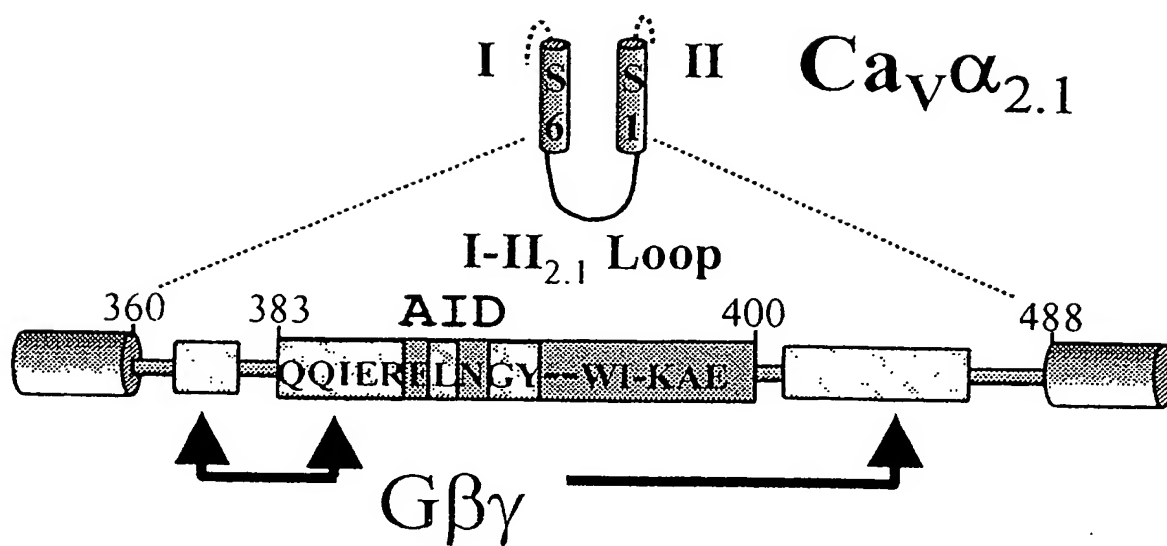


Figure 1

2/13

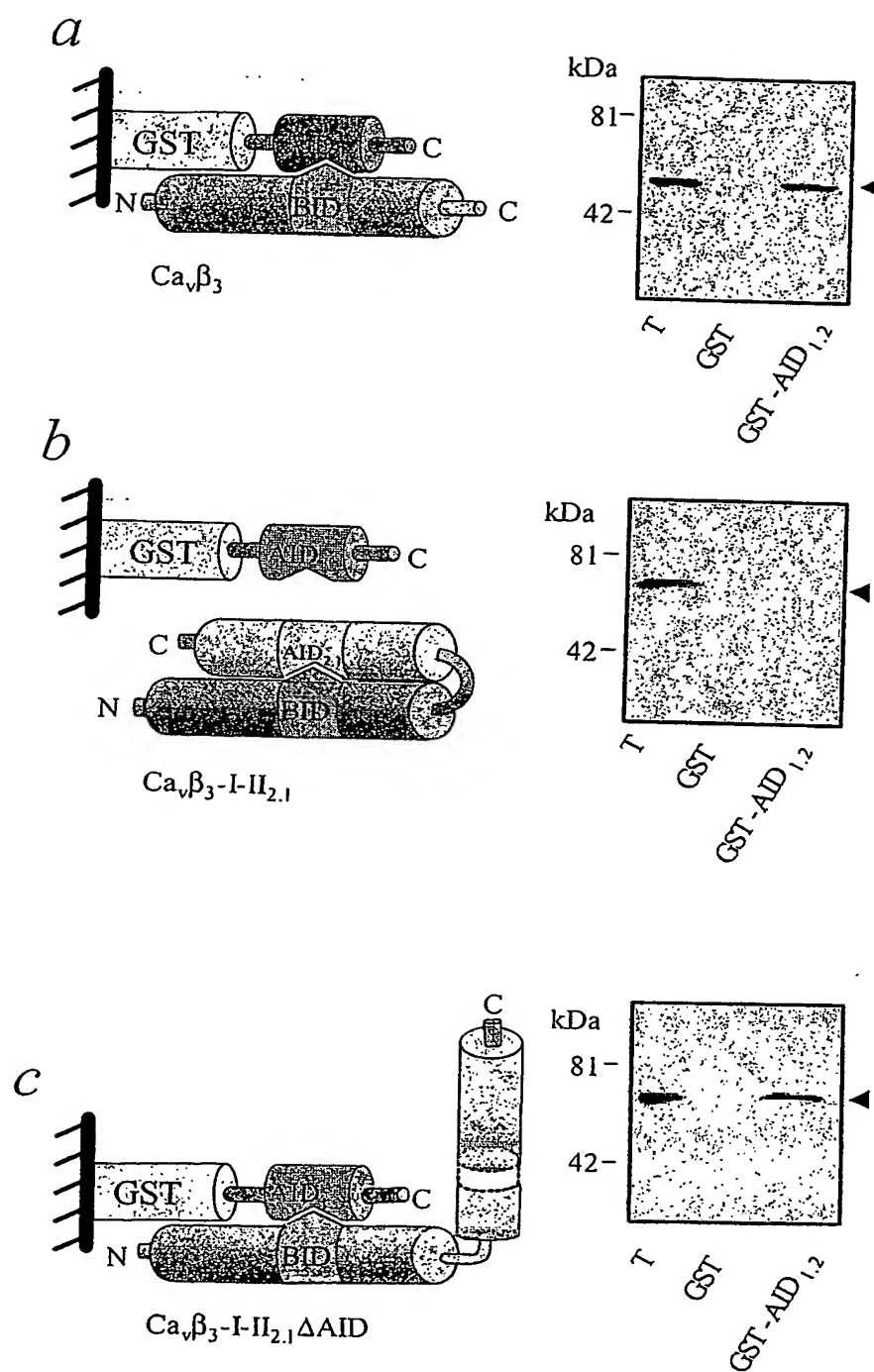


Figure 2

3/13

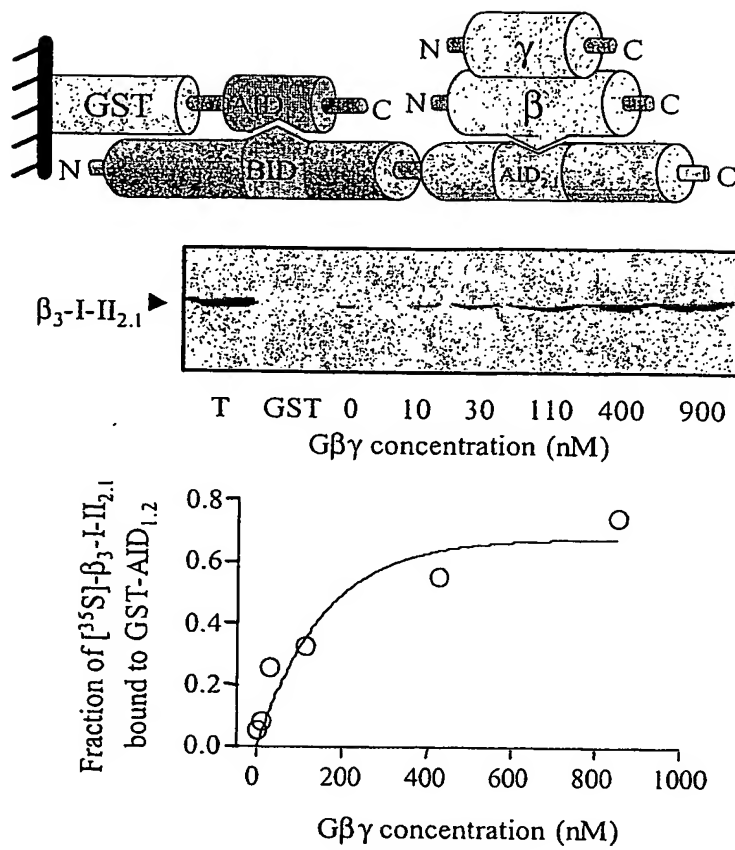


Figure 3

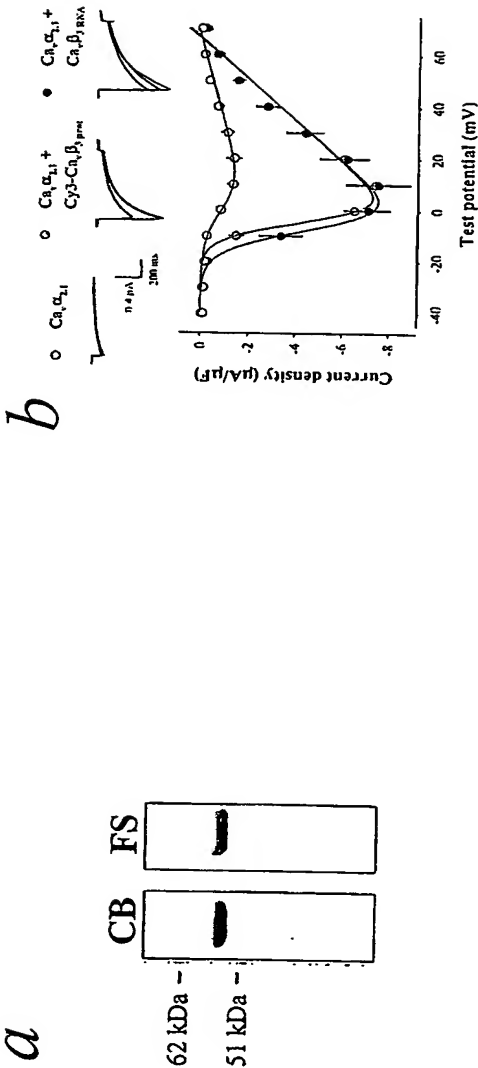


Figure 4

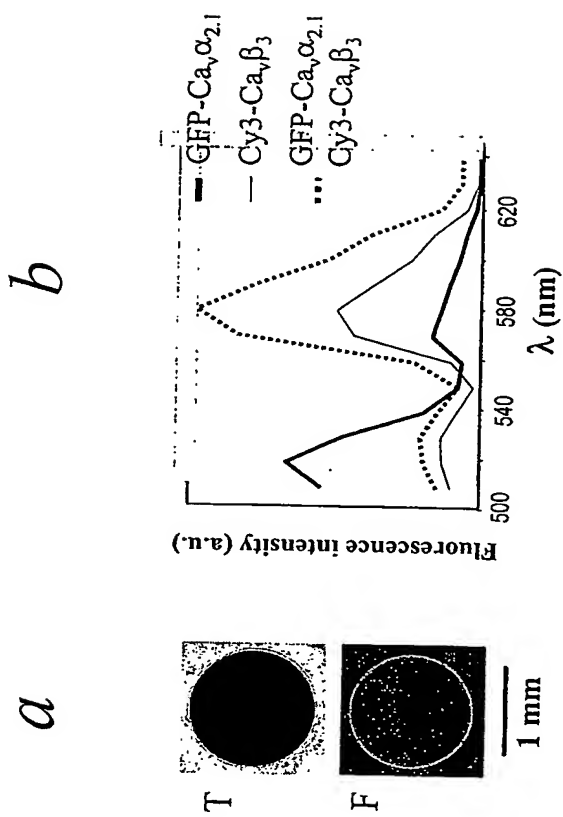


Figure 5

6/13

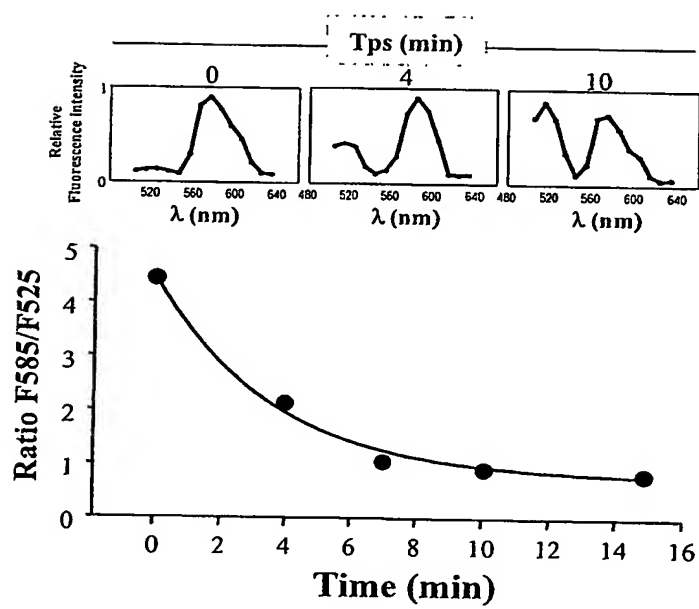


Figure 6

7/13

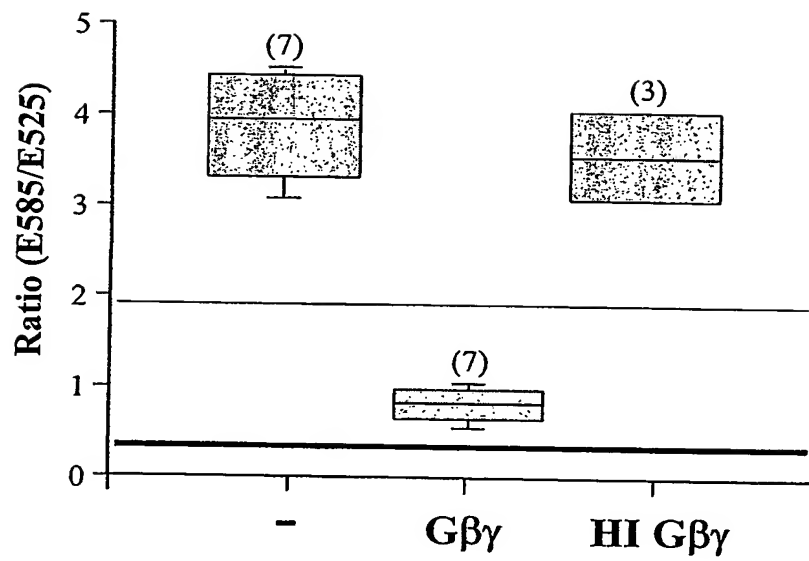


Figure 7

8/13

pcDNA3-Ca β 3-I-II2.1 (SEQ ID NO: 5)

```

1 ATGGATGACG ACTCCTACGT GCCCGGGTTT GAGGACTCGG AGGCGGGTTC
51 AGCCGACTCC TACACCAGCC GCCCTCTCTT GGACTCAGAC GTTTCCTTGG
101 AGGAGGACCG GGAGAGTGCC CGGCGAGAAG TGGAGAGTCA GGCTCAGCAG
151 CAGCTGGAAA GAGCCAAGCA CAAACCTGTG GCATTTGCTG TGAGGACCAA
201 TGTGAGCTAC TGTGGAGTTC TGGATGAGGA ATGCCCAGTC CAGGGCTCTG
251 GAGTCAACTT CGAGGCCAAA GATTTTCTGC ACATTAAAGA GAAGTACAGC
301 AATGACTGGT GGATCGGGAG GCTAGTGAAG GAAGGTGGCG ATATTGCCTT
351 CATCCCCAGC CCCAACGCC TGGAGAGCAT CCGGCTCAA CAGGAACAGA
401 AGGCCAGGAG ATCCGGGAAC CCTTCCAGCC TGAGTGACAT TGGCAACCGA
451 CGTTCCTCTC CTCCATCTCT AGCCAAGCAG AAGCAAAAGC AGGCGGAACA
501 TGTCCCCCGG TATGATGTGG TGCCCTCCAT GCGGCTGTG GTGCTGGTGG
551 GACCTCTCTT GAAAGGTTAT GAGGTACAG ACATGATGCA GAAGGCTCTC
601 TTGCACTTCC TTAAACACAG GTTTGATGGC AGGATCTCCA TCACCCGCGT
651 CACGGCTGAC CTCTCACTGG CCAAGCGCTC TGTGCTCAAC AATCCTGGCA
701 AGAGGACCAT CATCGAGCGC TCTTCTGCCC GCTCCAGCAT TGCTGAGGTG
751 CAGAGTGAGA TTGAGCGCAT ATTCGAGCTG GCCAAATCCC TGCAGTAGT
801 GGTGTTGGAT GCTGACACCA TCAACCACCC AGCACAGCTA GCCAAGACCT
851 CACTGGCCCC CATCATCGTC TTCGTCAAAG TGTCTCGCC AAAGGTACTG
901 CAGCGACTGA TCCGCTCCAG GGGGAAGTCC CAGATGAAGC ACCTCACTGT
951 ACAGATGATG GCATATGATA AGCTGGTTCA GTGCCACCT GAGTCATTTG
1001 ATGTGATTCT GGATGAGAAC CAGCTGGACG ACGCTGTGA GCACCTAGCT
1051 GAATACCTAG AGGTTTACTG GCGCGCTACC CACCACCCAG CACCGGGCCC
1101 CGGGATGCTG GGTCCGCCCA GTGCCATCCC TGGACTTCAG AACCAGCAGC
1151 TGCTGGGGGA GCGAGGTGAG GAGCATTAC CCCTGGAGCG GGACAGTTTG
1201 ATGCCCTCGG ATGAGGCCAG TGAGAGCTCC CGCCAGGCCT GGACCGGATC
1251 TTCACAGCGC AGCTCCCGCC ATCTGGAGGA GGACTATGCA GATGCCTACC
1301 AGGACCTGTA CCAGCCTCAC CGTCAACACA CCTCGGGGCT ACCCAGTGCT
1351 AACGGGCATG ACCCCCAAGA CCGGCTCCTA GCCCAGGACT CGGAGCATGA
1401 CCACAATGAC CGGAAGTGGC AGCGTAACCG GCCTTGGCCT AAGGACAGCT
1451 ACGAATTCGC CAAAGAAAGG GAGCGGGTGG AGAACCAGCG CGCATTCTGT
1501 AAGCTGCGGC GGCAGCAGCA GATTGAACGC GAGCTCAACG GGTACATGGA
1551 GTGGATCTCA AAAGCAGAAG AGGTGATCCT CGCAGAGGAC GAGACCGACG
1601 TGGAGCAGAG ACATCCCTTT GATGGAGCTC TGCGGAGAGC CACTATCAAG
1651 AAGAGCAAGA CGGACCTGCT CCACCCAGAG GAGGCGGAGG ATCAGCTGGC
1701 CGACATCGCC TCCGTGGGGT CTCCCTTTGC CCGAGCCAGC ATTTAAAGTG
1751 CCAAGCTGGA GAACTCGAGT TTTTTCACAA AAAAAGAGAG GAGAATGCGT
1801 TTCTACATCC GTCGCATGGT CAAAACTCAG TAAGAATTCT GCAGATATCC
1851 ATCACACTGG CGGCCGCTCG AGCATGCATC TAGAGGGCCC TATTCATAG
1901 TGTCACCTAA ATGCTAGAGC TCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCCTCTAG
1951 TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCTTGG
2001 AAGGTGCCAC TCCCACTGTC CTTTCCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG
2051 CATGTCTGTA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGCGAGGA
2101 CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AACACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG
2151 TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG
2201 TATCCCCACG CGCCCTGTAG CGGCGCATT AAGCGGCGGG GTGTGTTGGT
2251 TACGCGCAGC GTGACCGCTA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT
2301 TCGCTTTCTT CCCTTCCTTT CTCGCCACGT TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA
2351 GCTCTAAATC GGGGCATCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG CTTTACGGCA
2401 CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT
2451 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT
2501 AATAGTGGAC TCTTGTTCCT AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT
2551 CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGGG GATTTGCGCC TATTGGTTAA
2601 AAAATGAGCT GATTTAACA AAATTTAAG CGAATTAATT CTGTGGAATG
2651 TGTGTGAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTCCCCAGG CAGGCAGAAG
2701 TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT GGAAAGTCCC

```

Figure 8a

9/13

2751 CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA
 2801 GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC ATCCCGCCCC TAACTCCGCC
 2851 CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG
 2901 CAGAGGCCGA GGCCGCCTCT GCCTCTGAGC TATTCCAGAA GTAGTGAGGA
 2951 GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA AAGCTCCCGG GAGCTTGTAT
 3001 ATCCATTTTC GGATCTGATC AAGAGACAGG ATGAGGATCG TTTCGCATGA
 3051 TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG GGTGGAGAGG
 3101 CTATTCCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT CTGATGCCGC
 3151 CGTGTTCCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCTTTTT GTCAAGACCG
 3201 ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAAGTGCAGG ACGAGGCAGC GCGGCTATCG
 3251 TGGCTGGCCA CGACGGGCGT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG ACCTTGTAC
 3301 TGAAGCGGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG GGGCAGGATC
 3351 TCCTGTCAATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT CATGGCTGAT
 3401 GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC CATTCGACCA
 3451 CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCACG TACTCGGATG GAAGCCGGTC
 3501 TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CGCGCCAGCC
 3551 GAACGTTCG CCAGGCTCAA GGCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT
 3601 CGTGACCCAT GGCGATGCC TTTGCCGAA TATCATGGTG GAAAATGGCC
 3651 GCTTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC GGACCGCTAT
 3701 CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC TTGGCGGCGA
 3751 ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTCG
 3801 AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG AGCGGGACTC
 3851 TGGGGTTCTGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC ATCAGGAGAT
 3901 TTCGATTCCA CCGCCGCCCT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG GAATCGTTTT
 3951 CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC ATGCTGGAGT
 4001 TCTTCGCCCC CCCCACCTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA
 4051 AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA GCATTTTTTT CACTGCATTC
 4101 TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT GTCTGTATAC
 4151 CGTCGACCTC TAGCTAGAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCTT
 4201 GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG
 4251 CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTAA
 4301 TTGCGTTGCG CTCACCTGCC GCTTTCAGT CEGGAAACCT GTCGTGCCAG
 4351 CTGCATTAAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TGCGTATTGG
 4401 GCGCTCTTCC GCTTCTCTCG TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGC
 4451 TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA
 4501 GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA
 4551 GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC
 4601 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA
 4651 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT
 4701 CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCC
 4751 TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC AATGCTCACG CTGTAGGTAT
 4801 CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC
 4851 CCCCCTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT CGTCTTGAGT
 4901 CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC
 4951 AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG
 5001 GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
 5051 TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC
 5101 AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT
 5151 TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG
 5201 GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG
 5251 AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAAT AAAAATGAAG
 5301 TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
 5351 AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA
 5401 TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACACGA TACGGGAGGG
 5451 CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC
 5501 CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC

Figure 8b

10/13

```

5551 AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG
5601 CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
5651 TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT
5701 TCATTTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT
5751 GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA
5801 GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT
5851 TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA
5901 CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
5951 GCGGCGCGTC AATACGGGAT AATACGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA
6001 GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAACTCT CAAGGATCTT
6051 ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAAGTGAT
6101 CTTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA
6151 AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT
6201 ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT
6251 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA
6301 GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCGACGGATC
6351 GGGAGATCTC CCGATCCCCT ATGGTCGACT CTCAGTACAA TCTGCTCTGA
6401 TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATCTGCTCCC TGCTTGTGTG TTGGAGGTCG
6451 CTGAGTAGTG CGCGAGCAAA ATTTAAGCTA CAACAAGGCA AGGCTTGACC
6501 GACAATTGCA TGAAGAATCT GCTTAGGGTT AGGCGTTTTG CGCTGCTTCG
6551 CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
6601 AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC
6651 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCC CTTGGCTGAC CGCCCAACGA
6701 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCACATA GTAACGCCAA
6751 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
6801 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
6851 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT
6901 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
6951 ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
7001 TGACTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATGACGTC AATGGGAGTT
7051 TGTTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACAACCTC
7101 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
7151 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
7201 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGA CC

```

Figure 8c

11/13

pCHIC (SEQ ID NO: 10)

```

1 ATGCTGTGCT GTATGAGAAG AACCAAACAG GTTGAAAAGA ATGATGAGGA
51 CAAAAAGATC ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCAACC GGGGTGGTGC
101 CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG
151 TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT
201 CATCTGCACC ACCGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA
251 CCTTCGGCTA CGGCCTGCAG TGCTTCGCCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
301 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG
351 CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA
401 AGTTCGAGGG CGACACCCGT GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC
451 TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA
501 CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG
551 TGAAC TTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC
601 GACCACTACC AGCAGAACAC CCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC
651 CGACAACCAC TACCTGAGCT ACCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG
701 AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC GCCCGGGATC
751 ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACGCGATC GCATCTCTAG CCAAGCAGAA
801 GCAAAAGCAG GCGGAACATG TCCCCCGTA TGATGTGGTG CCCTCCATGC
851 GGCTGTGGT GCTGGTGGA CCCTCTCTGA AAGGTTATGA GGTCACAGAC
901 ATGATGCAGA AGGCTCTCTT CGACTTCCTT AAACACAGGT TTGATGGCAG
951 GATCTCCATC ACCCGCGTCA CGGCTGACCT CTCACTGGCC AAGCGCTCTG
1001 TGCTCAACAA TCCTGGCAAG AGGACCATCA TCGAGCGCTC TTCTGCCCGC
1051 TCCAGCATTG CTGAGGTGCA GAGTGAGATT GAGCGCATAT TCGAGCTGGC
1101 CAAATCCCTG CAGCTAGTGG TGTTGGATGC TGACACCATC AACCACCAG
1151 CACAGCTAGC CAAGACCTCA CTGGCCCCCA TCATCGTCTT CGTCAAAGTG
1201 TCCTCGCCAA AGGTACTGCA GCGACTGATC CGCTCCAGGG GGAAGTCCCA
1251 GATGAAGCAC CTCACTGTAC AGATGATGGC ATATGATAAG CTGGTTCAGT
1301 GCCCACCTGA GTCATTTGAT GTGATTCTGG ATGAGAACCA GCTGGACGAC
1351 GCCTGTGAGC ACCTAGCTGA ATACCTAGAG GTTACTGGC GCGCTACCCA
1401 CCACCCAGCA CCGGGCCCCG GGATGCTGGG TCCGCCAGT GCCATCCCTG
1451 GACTTCAGAA CCAGCAGCTG CTGGGGGAGC GAGGTGAGGA GCATTACCC
1501 CTGGAGCGGG ACAGTTTGAT GCCCTCGGAT GAGGCCAGTG AGAGCTCCCG
1551 CCAGGCCTGG ACCGGATCTT CACAGCGCAG CTCCCGCCAT CTGGAGGAGG
1601 ACTATGCAGA TGCCTACCAG GACCTGTACC AGCCTCACC GTCACACACC
1651 TCGGGGCTAC CCAGTGCTAA CGGGCATGAC CCCCAAGACC GGCTCCTAGC
1701 CCAGGACTCG GAGCATGACC ACAATGACCG GAACTGGCAG CGTAACCGGC
1751 CTTGGCCTAA GGACAGCTAC GAATTCGCCA AAGAAAGGGA GCGGGTGGAG
1801 AACC GGCGC CATTCTGAA GCTGCGGCGG CAGCAGCAGA TTGAACGCGA
1851 GCTCAACGGG TACATGGAGT GGATCTCAA AGCAGAAGAG GTGATCCTCG
1901 CAGAGGACGA GACCGACGTG GAGCAGAGAC ATCCCTTTGA TGGAGCTCTG
1951 CGGAGAGCCA CTATCAAGAA GAGCAAGACG GACCTGCTCC ACCCAGAGGA
2001 GGCGGAGGAT CAGCTGGCCG ACATCGCCTC CGTGGGGTCT CCCTTTGCCC
2051 GAGCCAGCAT TAAAAGTGCC AAGCTGGAGA ACTCGAGTTT TTTCCACAAA
2101 AAAGAGAGGA GAATGCGTTT CTACATCCGT CGCATGGTCA AAACCTAGAC
2151 TAGTATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCATCC
2201 TGGTTCGAGCT GGACGGCGAC GTAAACGGCC ACAGGTTTCA CGTGTCCGGC
2251 GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG CTGACCCTGA AGTTCATCTG
2301 CACCACCGGC AAGCTGCCCC TGCCCTGGCC CACCCTCGTG ACCACCCTGA
2351 CCTGGGGCGT GCAGTGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC
2401 GACTTCTTCA AGTCCGCCAT GCCGAAGGC TACGTCCAGG AGCGCACCAT
2451 CTTCTTCAAG GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTTCG
2501 AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATCGAGC TGAAGGGCAT GACTTCAAG
2551 GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC ATATCAGCCA
2601 CAACGTCTAT ATCACCGCCG ACAAGCAGAA GAACGGCATC AAGGCCAACT
2651 TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC
2701 TACCAGCAGA ACACCCCAT CGGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA

```

Figure 9a

12/13

```

2751 CCACTACCTG AGCACCCAGT CCGCCCTGAG CAAAGACCCC AAGGAGAAGC
2801 GCGATCACAT GGTCCCTGCTG GAGTTCGTGA CCGCCGCCGG GATCACTCTC
2851 GGCAGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA
2901 GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACGTGA TTCTAGTTGT
2951 GGTTCGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAA GCGGTAAATT GTAAGCGTTA
3001 ATATTTTGTG AAAATTCGCG TTAATTTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT
3051 AACCAATAGG CCGAAATCGG CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGAATAGAC
3101 CGAGATAGGG TTGAGTGTTG TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA
3151 AGAACGTGGA CTCCAACGTC AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT
3201 GGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTG
3251 CCGTAAAGCA CTAAATCGGA ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT
3301 GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA
3351 GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA GCGGTCACGC TGCGCGTAAC
3401 CACCACACCC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT ACAGGGCGCG TCAGGTGGCA
3451 CTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
3501 CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA
3551 ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTCCTGAGGC GGAAAGAACC AGCTGTGGAA
3601 TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA
3651 GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCAGGTG TGGAAAGTCC
3701 CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
3751 AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC TAACTCCGC
3801 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT
3851 GCAGAGGCCG AGGCCGCCCTC GGCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
3901 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AGATCGATCA AGAGACAGGA
3951 TGAGGATCGT TTCGCATGAT TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC
4001 GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCGGCTA TGACTGGGCA CAACAGACAA
4051 TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCCGGC TGTACGCGCA GGGGCGCCCCG
4101 GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAAGA
4151 CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CCTGCGCAG
4201 CTGTGCTCGA CGTTGTCACT GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGGC
4251 GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCATCT CACCTTGCTC CTGCCGAGAA
4301 AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTGATCCGG
4351 CTACCTGCCC ATTTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT
4401 ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
4451 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTTCG CAGGCTCAAG GCGAGCATGC
4501 CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCCT GTTGCCGAAT
4551 ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGGCT
4601 GGGTGTGGCG GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG
4651 CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGCTGACC GCTTCCTCGT GCTTTACGGT
4701 ATCGCCGCTC CCGATTGCA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA
4751 GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTGAA ATGACCGACC AAGCGACGCC
4801 CAACCTGCCA TCACGAGATT TCGATTCCAC CGCCGCCCTT TATGAAAGGT
4851 TGGGCTTCGG AATCGTTTTT CCGGACGCCG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC
4901 GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTGCCCCAC CCTAGGGGGA GGCTAACTGA
4951 AACACGGAAG GAGACAATAC CGGAAGGAAC CCGCGCTATG ACGGCAATAA
5001 AAAGACAGAA TAAAACGCAC GGTGTTGGGT CGTTTGTTCA TAAACGCGGG
5051 GTTCGGTCCC AGGGCTGGCA CTCTGTCGAT ACCCCACCGA GACCCCATTG
5101 GGGCCAATAC GCCCGCGTTT CTTCTTTTTC CCCACCCAC CCCCCAAGTT
5151 CGGGTGAAGG CCCAGGGCTC GCAGCCAAAC TCGGGGCGGC AGGCCCTGCC
5201 ATAGCCTCAG GTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACTTCATTT
5251 TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA
5301 AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA
5351 AAGATCAAAG GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG
5401 CTTGCAAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGATC
5451 AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG
5501 ATACCAAATA CTGTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA

```

Figure 9b

13/13

```
5551 GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG
5601 TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA
5651 CGATAGTTAC CGGATAAGGC GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGGTTCTGTG
5701 CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACCTAC
5751 AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC
5801 AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCGGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
5851 TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTCGGG TTTGCCACC
5901 TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA
5951 TGGAAAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTTA CGGTTCTTGG CCTTTTGCTG
6001 GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCTGCGTTC ATCCCCTGAT TCTGTGGATA
6051 ACCGTATTAC CGCCATGCAT TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC
6101 ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA
6151 ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA
6201 ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA
6251 ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
6301 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
6351 GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA
6401 GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTGGC
6451 AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT
6501 CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG
6551 GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
6601 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC
6651 CGTCAGATCC GCTAGCGCTA CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA
6701 ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG GATCCACCGG TCGCCACC
```

Figure 9c

SEQUENCE LISTING

<110> Commissariat à l'Energie Atomique

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

DE WAARD, Michel

DUPUIS, Alain

GRUNWALD, Didier

SANDOZ, Guillaume

<120> Protéine chimérique pour le criblage d'agonistes et d'antagonistes des voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs couplés aux protéines G

<130> 263PCT87

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 1

tttggtacca tggatgacga ctctacgtg cccgggtttg aggactcgga ggcggggtt 58

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 2	
gcggaattcg tagctgtcct taggccaagg ccggttacgc tgccagtt	48
<210> 3	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> amorce	
<400> 3	
ggggaattcg ccaaagaaag ggagcgggtg gagaac	36
<210> 4	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> amorce	
<400> 4	
tttgaattct tactgagttt tgaccatgcg acggatgtag aaacgcattc t	51
<210> 5	
<211> 7242	
<212> DNA	
<213> artificial sequence	
<220>	
<223> plasmide recombinant	
<400> 5	
atggatgacg actcctacgt gcccggggttt gaggactcgg aggcggggttc agccgactcc	60
tacacacgct gcccctctct ggactcagac gtttccctgg aggaggaccg ggagagtgcc	120
cggcgagaag tggagagtca ggctcagcag cagctggaaa gagccaagca caaacctgtg	180
gcatttgctg tgaggaccaa tgtcagctac tgtggagttc tggatgagga atgcccagtc	240
cgggctctg gagtcaactt cgaggccaaa gattttctgc acattaaaga gaagtacagc	300
aatgactggg ggatcgggag gctagtgaag gaaggtggcg atattgcctt catccccagc	360
ccccaacgcc tggagagcat ccggctcaaa caggaacaga aggccaggag atccgggaac	420

ccttccagcc	tgagtacat	tggcaaccga	cgttcccctc	ctccatctct	agccaagcag	480
aagcaaaagc	aggcgggaaca	tgtccccccg	tatgatgtgg	tgccctccat	gcggcctgtg	540
gtgctggtgg	gaccctctct	gaaaggttat	gaggtcacag	acatgatgca	gaaggctctc	600
ttcgacttcc	ttaaacacag	gtttgatggc	aggatctcca	tcacccgcgt	cacggctgac	660
ctctcactgg	ccaagcgctc	tgtgctcaac	aatcctggca	agaggaccat	catcgagcgc	720
tcttctgccc	gctccagcat	tgctgaggtg	cagagtgaga	ttgagcgc	attcgagctg	780
gccaaatccc	tgcagctagt	ggtgttggat	gctgacacca	tcaaccaccc	agcacagcta	840
gccaagacct	cactggcccc	catcatcgct	ttcgtcaaag	tgtcctcgcc	aaaggtactg	900
cagcgactga	tccgctccag	ggggaagtcc	cagatgaagc	acctcactgt	acagatgatg	960
gcatatgata	agctggttca	gtgcccacct	gagtcatttg	atgtgattct	ggatgagaac	1020
cagctggacg	acgcctgtga	gcacctagct	gaatacctag	aggtttactg	gcgcgctacc	1080
caccacccag	caccggggccc	cgggatgctg	ggtccgccc	gtgccatccc	tggacttcag	1140
aaccagcagc	tgctggggga	gcgaggtgag	gagcattcac	ccctggagcg	ggacagtttg	1200
atgccctcgg	atgaggccag	tgagagctcc	cgccaggcct	ggaccggatc	ttcacagcgc	1260
agctcccgcc	atctggagga	ggactatgca	gatgcctacc	aggacctgta	ccagcctcac	1320
cgtcaacaca	cctcgggggct	accagtgct	aacgggcatg	acccccaaga	ccggctccta	1380
gcccaggact	cggagcatga	ccacaatgac	cggaaactggc	agcgtaaccg	gccttggcct	1440
aaggacagct	acgaattcgc	caaagaaagg	gagcgggtgg	agaaccggcg	cgcattcctg	1500
aagctgcggc	ggcagcagca	gattgaacgc	gagctcaacg	ggtacatgga	gtggatctca	1560
aaagcagaag	aggtgatcct	cgcagaggac	gagaccgacg	tggagcagag	acatcccttt	1620
gatggagctc	tgcgagagc	cactatcaag	aagagcaaga	cggacctgct	ccaccagag	1680
gaggcggagg	atcagctggc	cgacatcgcc	tccgtgggg	ctccctttgc	ccgagccagc	1740
attaaaagtg	ccaagctgga	gaactcgagt	tttttccaca	aaaaagagag	gagaatgcgt	1800
ttctacatcc	gtcgcattgg	caaaactcag	taagaattct	gcagatatcc	atcacactgg	1860
cggccgctcg	agcatgcac	tagaggcccc	tattctatag	tgtcacctaa	atgctagagc	1920
tcgctgatca	gcctcgactg	tgccttctag	ttgccagcca	tctgttgttt	gcccctcccc	1980
cgtgccttcc	ttgaccttg	aaggtgccac	tcccactgtc	ctttccta	aaaatgagga	2040
aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	ttctattctg	gggggtgggg	tggggcagga	2100
cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgcgg	tgggctctat	2160
ggcttctgag	gcggaaagaa	ccagctgggg	ctctaggggg	tatccccacg	cgccctgtag	2220
cggcgcatta	agcgcggcgg	gtgtggtggt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	2280
cgccctagcg	cccgtcctt	tcgctttctt	cccttccttt	ctcgccacgt	tcgccggcctt	2340
tccccgtcaa	gctctaaatc	ggggcatccc	tttagggttc	cgatttagtg	ctttacggca	2400
cctcgacccc	aaaaaacttg	attaggggtga	tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	2460

gacgggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	2520
aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggc	ctattctttt	gatttataag	ggattttggg	2580
gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattaatt	2640
ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtga	aagtccccag	gctccccagg	caggcagaag	2700
tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccagggtg	ggaaagtccc	caggctcccc	2760
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtc	gcaaccatag	tcccgcctct	2820
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	2880
actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	2940
gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctcccgg	gagcttgat	3000
atccattttc	ggatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	3060
tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	3120
acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	3180
ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	3240
gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	3300
tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	3360
tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	3420
gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcga	catcgcatcg	agcgagcacg	3480
tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	3540
cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgcggcgg	aggatctcgt	3600
cgtgacccat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttcttg	3660
attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	3720
ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttcctcg	tgctttacgg	3780
tatcgccgct	cccgatccgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	3840
agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	3900
ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	3960
ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccaaacttg	4020
tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	4080
gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcacaaatgt	atcttatcat	4140
gtctgtatac	cgtcgacctc	tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	4200
gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	4260
aaagcctggg	gtgcctaata	agtgcgctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	4320
gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcc	acgcgcgggg	4380
agaggcgggt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	4440
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	4500

gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	t9agcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	4560
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	4620
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	4680
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgtttccga	ccctgccgct	taccggatac	4740
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgctg	gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtaggtat	4800
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	4860
cccgaaccgct	gcgccttatc	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggg	aagacacgac	4920
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4980
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggg	5040
atctgcgctc	tgtgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	5100
aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	5160
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggctctgacgc	tcagtggaac	5220
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	5280
cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtct	5340
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	5400
tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	5460
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	5520
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	5580
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	5640
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggatatggct	5700
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttggtgcaaa	5760
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	5820
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	5880
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	5940
gctccttc	gcccggcgctc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	6000
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	6060
aatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	6120
accagcgt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	6180
ccgacagg	ctgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	6240
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	6300
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tcgacggatc	gggagatctc	6360
ctgatccct	atggctgact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	6420
ctctgtcttc	tgcttgtgtg	ttggaggtcg	ctgagtagtg	cgcgagcaaa	atttaagcta	6480
caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgca	tgaagaatct	gcttaggggt	aggcgttttg	6540

cgctgcttcg cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt 6600
 aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 6660
 aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa 6720
 taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 6780
 actattttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 6840
 cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 6900
 tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga 6960
 tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 7020
 gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatcaa cgggactttc 7080
 caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg 7140
 aggtctatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg 7200
 aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttggtgta cc 7242

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 6

agccgtacgc gatcgcatct ctagccaagc agaagcaaa 39

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 7

cccgttaacc ccactagtct gagttttgac catgcgacgg at 42

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 8

gggactagta tggtagagcaa gggcgaggag ctg

33

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 9

cccgttaact gccgagagtg atcccggcgg cggt

34

<210> 10

<211> 7242

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> plasmide recombinant

<400> 10

atggatgacg actcctacgt gcccgggttt gaggactcgg aggcgggttc agccgactcc	60
tacaccagcc gccctctctt ggactcagac gtttccctgg aggaggaccg ggagagtgcc	120
ggcgagaag tggagagtca ggctcagcag cagctggaaa gagccaagca caaacctgtg	180
gcatttgctg tgaggaccaa tgtcagctac tgtggagttc tggatgagga atgcccagtc	240
cagggtctg gagtcaactt cgaggccaaa gattttctgc acattaaaga gaagtacagc	300
aatgactggg ggatcgggag gctagtgaag gaaggtggcg atattgcctt catccccagc	360
ccccacgc tggagagcat ccggctcaaa caggaacaga aggccaggag atccgggaac	420
ccttcagcc tgagtgcacat tggcaaccga cgttcccctc ctccatctct agccaagcag	480
aagcaaaagc aggcggaaca tgtcccccg tatgatgtgg tgccctccat gcggcctgtg	540
ggtctggtgg gaccctctct gaaagggttat gaggtcacag acatgatgca gaaggctctc	600
ttcgacttcc ttaaacacag gtttgatggc aggatctcca tcacccgcgt cacggctgac	660
ctctcactgg ccaagcgtc tgtgctcaac aatcctggca agaggaccat catcgagcgc	720

tcttctgccc gctccagcat tgctgaggtg cagagtgaga ttgagcgcat attcgagctg	780
gccaaatccc tgcagctagt ggtgttgat gctgacacca tcaaccaccc agcacagcta	840
gccaaagacct cactggcccc catcatcgtc ttcgtcaaag tgcctcgc aaaggtactg	900
cagcgactga tccgctccag ggggaagtcc cagatgaagc acctcactgt acagatgatg	960
gcatatgata agctggttca gtgcccacct gaggcatttg atgtgattct ggatgagaac	1020
cagctggacg acgcctgtga gcacctagct gaatacctag aggtttactg gcgcgctacc	1080
caccacccag caccgggccc cgggatgctg ggtccgcccc gtgccatccc tggacttcag	1140
aaccagcagc tgctggggga gcgaggtgag gaggcattcac ccctggagcg ggacagtttg	1200
atgccctcgg atgaggccag tgagagctcc cgccaggcct ggaccggatc ttcacagcgc	1260
agctcccgcc atctggagga ggactatgca gatgcctacc aggacctgta ccagcctcac	1320
cgtaacaca cctcggggct acccagtgt aacgggcatg accccaaga ccggctccta	1380
gcccaggact cggagcatga ccacaatgac cgggaactggc agcgtaaccg gccttggcct	1440
aaggacagct acgaattcgc caaagaaagg gagcgggtgg agaaccggcg cgcattcctg	1500
aagctgcggc ggcagcagca gattgaacgc gagctcaacg ggtacatgga gtggatctca	1560
aaagcagaag aggtgatcct cgcagaggac gagaccgacg tggagcagag acatcccttt	1620
gatggagctc tgcggagagc cactatcaag aagagcaaga cggacctgct ccaccagag	1680
gaggcggagg atcagctggc cgacatcgcc tccgtggggt ctccctttgc ccgagccagc	1740
attaaaagtg ccaagctgga gaactcgagt tttttccaca aaaaagagag gagaatgcgt	1800
ttctacatcc gtcgcatggt caaaactcag taagaattct gcagatatcc atcacactgg	1860
cggccgctcg agcatgcatc tagagggcc tattctatag tgtcacctaa atgctagagc	1920
tcgctgatca gcctcgaactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc	1980
cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga	2040
aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga	2100
cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat	2160
ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag	2220
cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag	2280
cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttcctt ctcgccacgt tcgccggctt	2340
tccccgtcaa gctctaaatc ggggcatccc tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca	2400
cctcgacccc aaaaaacttg attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata	2460
gacggttttt cgccctttga cgttggagtc caggttcttt aatagtggac tcttgttcca	2520
aactggaaca acactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatattataag ggattttggg	2580
gatttcggcc tattgggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt	2640
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagg caggcagaag	2700
tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc	2760

agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccctt	2820
aactccgccc atcccgcctt taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg	2880
actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa	2940
gtagttagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgat	3000
atccattttt ggatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga	3060
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc	3120
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc	3180
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc	3240
gcggctatcg tggctggcca cgacgggctt tccttgccga gctgtgctcg acgttgctac	3300
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc	3360
tcacctgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac	3420
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg	3480
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct	3540
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcgct cccgacggcg aggatctcgt	3600
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg	3660
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac	3720
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg	3780
tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgac cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg	3840
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat	3900
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc	3960
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca ccccaacttg	4020
tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa	4080
gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat	4140
gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct	4200
gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt	4260
aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc	4320
gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg	4380
agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tctactgactc gctgcgctcg	4440
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca	4500
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac	4560
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	4620
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg	4680
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	4740
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat	4800

ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	4860
cccgaccgct	gcgcccttatc	cggttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	4920
ttatcggcac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	4980
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttgggt	5040
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	5100
aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	5160
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggctctgacgc	tcagtggaac	5220
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	5280
cttttaaatt	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtct	5340
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	5400
tccatagtgtg	cctgactccc	cgctgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	5460
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	5520
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	5580
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	5640
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	5700
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	5760
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	5820
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	5880
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	5940
agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	6000
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	6060
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	6120
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	6180
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	6240
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	6300
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tcgacggatc	gggagatctc	6360
ccgatcccct	atggctgact	ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	6420
atctgctccc	tgcttgtgtg	ttggaggctg	ctgagtagtg	cgcgagcaaa	atttaagcta	6480
caacaaggca	aggcttgacc	gacaattgca	tgaagaatct	gcttaggggtt	aggcggtttg	6540
cgctgcttcg	cgatgtacgg	gccagatata	cgcgttgaca	ttgattattg	actagttatt	6600
aatagtaatc	aattacgggg	tcattagttc	atagcccata	tatggagttc	cgcgttacat	6660
aacttacggt	aaatggcccc	cctggctgac	cgcccaacga	cccccgccca	ttgacgtcaa	6720
taatgacgta	tgttcccata	gtaacgccaa	tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	6780
actattttacg	gtaaaactgcc	cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	6840

cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc cgcctggca ttatgcccag tacatgacct	6900
tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga	6960
tgcggttttg gcagtacatc aatgggctg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa	7020
gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc	7080
caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtggg	7140
aggtctatat aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg	7200
aaattaatac gactcactat agggagaccc aagcttggtg cc	7242

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C12N15/12 C07K14/705 G01N33/68 C12Q1/68
C07K16/28 A01K67/027 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 329 156 B1 (CIRINO NICK M ET AL) 11 December 2001 (2001-12-11) column 6 * sequence ID no.5 *	18
A	JANETOPOULOS CHRIS ET AL: "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 291, no. 5512, 23 March 2001 (2001-03-23), pages 2408-2411, XP002187587 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document ----- -/-	1-33

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2004

Date of mailing of the international search report

21/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03860

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE WAARD MICHEL ET AL: "Properties of the alpha-1-beta Anchoring Site in Voltage-dependent Ca-2+ Channels" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 20, 19 May 1995 (1995-05-19), pages 12056-12064, XP002198860 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-33
A	DE WAARD MICHEL ET AL: "IDENTIFICATION OF CRITICAL AMINO ACIDS INVOLVED IN ALPHA-1-BETA INTERACTION IN VOLTAGE-DEPENDENT CA-2+ CHANNELS" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 380, no. 3, 1996, pages 272-276, XP002155228 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-33
A	SPAETGENS RENEE L ET AL: "Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alphaE calcium channels." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 32, 6 August 1999 (1999-08-06), pages 22428-22436, XP002255195 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-33
A	FURUKAWA TAIJI ET AL: "Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca2+ channels with G-protein alpha and betagamma subunits: II. Evidence for direct binding." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 28, 10 July 1998 (1998-07-10), pages 17595-17603, XP002255196 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-33
P,A	FR 2 827 867 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 31 January 2003 (2003-01-31)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03860

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
US 6329156	B1	11-12-2001	US	2004014707	A1	22-01-2004	
FR 2827867	A	31-01-2003	FR	2827867	A1	31-01-2003	
			CA	2455398	A1	13-02-2003	
			EP	1412386	A2	28-04-2004	
			WO	03011906	A2	13-02-2003	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/03860

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/62 C12N15/12 C07K14/705 G01N33/68 C12Q1/68
C07K16/28 A01K67/027 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 329 156 B1 (CIRINO NICK M ET AL) 11 décembre 2001 (2001-12-11) colonne 6 * sequence ID no.5 *	18
A	JANETOPOULOS CHRIS ET AL: "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 291, no. 5512, 23 mars 2001 (2001-03-23), pages 2408-2411, XP002187587 ISSN: 0036-8075 cité dans la demande le document en entier	1-33
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/03860

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DE WAARD MICHEL ET AL: "Properties of the alpha-1-beta Anchoring Site in Voltage-dependent Ca-2+ Channels" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 270, no. 20, 19 mai 1995 (1995-05-19), pages 12056-12064, XP002198860 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier</p>	1-33
A	<p>DE WAARD MICHEL ET AL: "IDENTIFICATION OF CRITICAL AMINO ACIDS INVOLVED IN ALPHA-1-BETA INTERACTION IN VOLTAGE-DEPENDENT CA-2+ CHANNELS" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 380, no. 3, 1996, pages 272-276, XP002155228 ISSN: 0014-5793 le document en entier</p>	1-33
A	<p>SPAETGENS RENEE L ET AL: "Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alpha1E calcium channels." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 32, 6 août 1999 (1999-08-06), pages 22428-22436, XP002255195 ISSN: 0021-9258 le document en entier</p>	1-33
A	<p>FURUKAWA TAIJI ET AL: "Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca2+ channels with G-protein alpha and betagamma subunits: II. Evidence for direct binding." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 28, 10 juillet 1998 (1998-07-10), pages 17595-17603, XP002255196 ISSN: 0021-9258 le document en entier</p>	1-33
P,A	<p>FR 2 827 867 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 31 janvier 2003 (2003-01-31)</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No

PCT/FR 03/03860

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 6329156	B1	11-12-2001	US	2004014707 A1	22-01-2004
FR 2827867	A	31-01-2003	FR	2827867 A1	31-01-2003
			CA	2455398 A1	13-02-2003
			EP	1412386 A2	28-04-2004
			WO	03011906 A2	13-02-2003